




OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25638

To cite this version:

Dauphin, Axelle . *Etude de l'expression immunohistochimique du CD20 au moyen d'un anticorps polyclonal dans le tissu lymphoïde normal et pathologique du chien et du chat*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 122 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE DE L'EXPRESSION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU CD20 AU MOYEN D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DANS LE TISSU LYMPHOÏDE NORMAL ET PATHOLOGIQUE DU CHIEN ET DU CHAT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Axelle DAUPHIN
Née, le 18 juillet 1995 à Frejus (83)

Directeur de thèse : Mr Maxence DELVERDIER

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAIDI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mr Maxence DELVERDIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Nathalie BOURGES

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

A Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI

Professeure à l'Université Paul Sabatier

Praticien Hospitalier

Cytologie et Histologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Maxence DELVERDIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie et Anatomie Pathologique

Pour votre encadrement tout au long de ce travail,

Sincères remerciements.

A Madame la Professeure Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Histologie

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse,

Sincères remerciements.

Table des matières

Table des abréviations _____	11
Table des illustrations _____	13
Table des annexes _____	15
Introduction _____	17
<i>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i> _____	19
I – IMMUNOHISTOCHIMIE : GENERALITES ET TECHNIQUE _____	21
1) Généralités _____	21
2) Importance de la fixation _____	22
3) Réactivation de l'antigène et blocage des réactions endogènes _____	22
4) Choix des anticorps utilisés _____	23
a. Structure et propriétés des anticorps _____	23
b. Anticorps polyclonaux _____	25
c. Anticorps monoclonaux _____	27
5) Systèmes de révélation _____	29
a. Immunohistochimie directe _____	29
b. Immunohistochimie indirecte _____	30
i. Méthodes enzyme-anti-enzyme (PAP ou APAAP) _____	30
ii. Méthode (strept)avidine-biotine ou (S)ABC _____	30
iii. Méthode LSAB _____	31
iv. Méthode polymère _____	31
v. Méthode sonde-polymère _____	32
vi. Technologie PLA (proximity ligation assay) Duolink® _____	32
6) Contrôles _____	34
7) Limites de l'immunohistochimie et techniques complémentaires _____	34
a. Limites de l'immunohistochimie _____	34
b. Diagnostic cytologique _____	35
c. Cytométrie en flux _____	36
d. Test de clonalité ou PARR _____	37

II - INTERET DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE DANS L'ETUDE DU TISSU LYMPHOIDE NORMAL ET PATHOLOGIQUE EN MEDECINE VETERINAIRE _____ 41

1) Classification des lymphomes _____	41
a. Généralités _____	41
b. Présentation clinique des lymphomes _____	41
i. Lymphomes du chien _____	42
ii. Lymphomes du chat _____	42
c. Stades cliniques _____	43
d. Evolution de la classification histologique des lymphomes _____	43
e. Détermination du grade histologique _____	47
f. Intérêt pronostique de la classification _____	48
i. Facteurs pronostiques chez le chien _____	48
ii. Facteurs pronostiques chez le chat _____	49
2) Diagnostic différentiel lymphome/hyperplasie _____	51
a. Au sein des nœuds lymphatiques _____	52
b. Au sein de la rate _____	53
3) Diagnostic différentiel lymphome digestif/MICI chez le chat _____	54
a. Echographie _____	54
b. Examen histologique _____	55
c. Intérêt de l'immunohistochimie _____	56
4) Diagnostic différentiel lymphome digestif/IBD chez le chien _____	57
a. Echographie _____	57
b. Examen histologique _____	58
c. Intérêt de l'immunohistochimie _____	58

III - LE CD20 : MOLECULE D'INTERET DANS L'ETUDE DES PROCESSUS IMPLIQUANT LES CELLULES B _____ 61

1) Structure et topographie du CD20 _____	63
a. Structure générale _____	64
b. Organisation membranaire _____	65
2) Fonction biologique du CD20 _____	65
a. CD20 et mouvements de calcium dans la cellule _____	66
b. CD20 et régulation du cycle cellulaire _____	67
c. CD20 et radeaux lipidiques _____	67
3) Intérêt du CD20 _____	68
a. Intérêt diagnostique _____	68

b. Intérêt thérapeutique _____	69
c. Intérêt pronostique _____	70

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE DE L'EXPRESSION IMMUNOHISTOCHEMIQUE DU CD20 AU MOYEN D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DANS LE TISSU LYMPHOÏDE NORMAL ET PATHOLOGIQUE DU CHIEN ET DU CHAT _____ 71

I – MATERIEL ET METHODES _____ 73

1) Anticorps utilisé _____	73
2) Choix des échantillons _____	73
3) Protocole utilisé _____	74
4) Etablissement de la grille de lecture _____	75

II – RESULTATS _____ 77

1) Tissu lymphoïde sain _____	77
a. Chien _____	77
i. Nœud lymphatique _____	77
ii. Rate _____	77
b. Chat _____	78
i. Rate _____	78
ii. Thymus _____	78
2) Tissu lymphoïde réactionnel _____	82
a. Chien _____	82
i. Nœud lymphatique _____	82
ii. Rate _____	82
iii. Plaques de Peyer _____	83
b. Chat _____	83
i. Nœud lymphatique _____	83
ii. Rate _____	85
3) Tissu lymphoïde pathologique _____	87
a. Chien _____	87
i. Lymphome B de haut grade de malignité _____	87
ii. Suspicion de lymphome de haut grade de malignité _____	89
iii. Suspicion de lymphome de grade inconnu _____	89

b.	Chat	91
i.	Lymphome B de haut grade de malignité	91
ii.	Suspicion de lymphome de haut grade de malignité	92
iii.	Lymphome B lymphoplasmocytaire	94
iv.	Lymphome B riche en cellules T	94
v.	Lymphome cutané T épithéliotrope	95
4)	Synthèse des résultats	97
a.	Populations cellulaires marquées	97
b.	Localisation du marquage	97
c.	Intensité du marquage	98
III –	DISCUSSION	99
1)	Caractéristiques du marquage obtenu	99
2)	Marquage des plasmocytes	99
3)	Intérêt de l'anticorps PA5-16701	100
4)	Comparaison avec d'autres marqueurs	101
a.	CD79a	101
b.	BLA36	102
c.	CD3	102
5)	Etude de la réactivité dans d'autres espèces	103
6)	Limites de l'étude et perspectives	104
	Conclusion	105
	Références bibliographiques	107
	Annexes	119

Table des abréviations

Ac : anticorps

ACVIM : *American College of Veterinary Internal Medicine*

ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ADN : acide désoxyribonucléique

APAAP : phosphatase alcaline anti-phosphatase alcaline

BCR : *B-cell receptor*

Ca²⁺ : calcium ionisé

CD : cluster de différenciation

CDC : *complement-dependent cytotoxicity*

CDR : *complementarity-determining regions*

CH : *constant heavy*

CL : *constant light*

Fab : *antigen-binding fragment*

Fc : *fragment crystallizable*

FeLV : *feline leukemia virus*

IBD : *inflammatory bowel disease*

Ig : immunoglobuline

kDA : kiloDalton

LSAB : *labeled streptavidin biotin*

mAb : anticorps monoclonal

MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MS4A : *membrane-spanning 4A*

pAb : anticorps polyclonal

PARR : *PCR for antigen receptor rearrangements*

PAP : peroxydase anti-peroxydase

PCD : *programmed cell death*

PCR : *polymerase chain reaction*

PLA : *proximity ligation assay*

REAL : *Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*

(S)ABC : (strept)avidine-biotine

VH : *variable heavy*

VL : *variable light*

WHO : *World Health Organization*

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : Structure générale d'un anticorps. D'après (Gómez Román, Murray and Weiner, 2013).....	24
Figure 2 : Processus de fabrication des anticorps polyclonaux. D'après (Parker et al., 2016)	27
Figure 3 : Processus de fabrication des anticorps monoclonaux. D'après (Parker et al., 2016)	28
Figure 4 : Immunohistochimie directe	29
Figure 5 : Techniques d'immunohistochimie indirecte.....	33
Figure 6 : Exemple d'un cytogramme de sang normal de chien.	37
Figure 7 : Différents profils possibles lors d'un test de clonalité. D'après (Bienzle and Vernau, 2011).....	38
Figure 8 : Rappels sur la lymphopoïèse	62
Figure 9 : Structure générale du CD20 au sein de la membrane	63
Figure 10 : Organisation membranaire du CD20. D'après (Congy-Jolivet and Cartron, 2014)	65
Figure 11 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x20) : marquage dans l'ensemble du parenchyme nodal.	80
Figure 12 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x100) : marquage des lymphocytes B au sein d'un follicule.	80
Figure 13 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x100) : marquage des lymphocytes B au sein du cortex profond et de la médulla.	80
Figure 14 : Rate, chat (expression du CD20, x20) : marquage au sein de la pulpe blanche. ...	81
Figure 15 : Rate, chat (expression du CD20, x200) : marquage cellulaire au sein d'un follicule splénique.....	81
Figure 16 : Thymus, chat (expression du CD20, x20) : marquage au sein de la jonction cortico-médullaire.....	81
Figure 17 : Thymus, chat (expression du CD20, x400) : marquage de lymphocytes au sein de la jonction cortico-médullaire.	81
Figure 18 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x20) : marquage au sein du cortex et des sinus.	86

Figure 19 : Iléon, chien (expression du CD20, x20) : marquage au sein des plaques de Peyer.	86
Figure 20 : Iléon, chien (expression du CD20, x100) : marquage des follicules et du tissu parafolliculaire.	86
Figure 21 : Iléon, chien (expression du CD20, x400) : marquage de lymphocytes au sein d'un follicule et du lymphoépithélium	86
Figure 22 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x40) : marquage de la totalité du parenchyme nodal.	90
Figure 23 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x1000) : marquage membranaire et cytoplasmique de la population tumorale.....	90
Figure 24 : Peau, chien (expression du CD20, x20) : marquage de cellules tumorales au sein de l'épiderme et du derme.	90
Figure 25 : Peau, chien (expression du CD20, x200) : marquage de cellules tumorales au sein du derme.	90
Figure 26 : Estomac, chat (expression du CD20, x100) : marquage de la totalité de la masse gastrique.	96
Figure 27 : Nœud lymphatique, chat (expression du CD20, x40) : marquage de follicules remaniés.	96
Figure 28 : Nœud lymphatique, chat (expression du CD20, x1000).....	96

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps polyclonaux et monoclonaux.....	25
Tableau 2 : Classification REAL-WHO.....	46
Tableau 3 : Critères cytologiques de différenciation entre lymphome et hyperplasie réactionnelle	52
Tableau 4 : Liste des clusters de différenciation les plus souvent utilisés pour l'immunophénotypage dans l'étude des pathologies de l'hématopoïèse du chien et du chat (Tvedten, 2012).	61

Note : les illustrations ne faisant pas l'objet d'une référence sont des compositions personnelles.

Table des annexes

Annexe 1 : Classification de Kiel

Annexe 2 : Classification de Lukes et Collins

Annexe 3 : Working Formulation

Annexe 4 : Classification de Kiel actualisée

Introduction

Le lymphome est la tumeur hématopoïétique la plus fréquente chez le chien et le chat : il représente à lui seul 7 à 10% des néoplasies rencontrées dans ces espèces. Le terme « lymphome » regroupe cependant une large gamme de présentations, dont les caractéristiques cliniques peuvent être relativement peu spécifiques. Ainsi, la première étape lors d'une suspicion de processus néoplasique réside dans la pose d'un diagnostic de certitude, et notamment l'exclusion de processus inflammatoires tels que l'hyperplasie lymphoïde ou la maladie inflammatoire chronique de l'intestin. En effet, toutes ces pathologies peuvent présenter des caractéristiques similaires ou ambiguës, à la fois sur le plan clinique, morphologique, ou histologique. Par la suite, une fois le diagnostic de lymphome posé, il est essentiel d'en établir les caractéristiques, afin de pouvoir réaliser la prise en charge adéquate. En effet, l'arsenal thérapeutique à utiliser et le pronostic dépendent significativement de l'immunophénotype du lymphome rencontré, ainsi que de son grade.

L'immunohistochimie présente un intérêt majeur dans l'ensemble de ce processus. Cette méthode, utilisée en routine en diagnostic vétérinaire, permet de poser le diagnostic puis de caractériser le profil phénotypique du lymphome en ciblant différentes protéines, et notamment le CD20. De par ses caractéristiques, le CD20 semble représenter une excellente cible pour le diagnostic des pathologies touchant les lymphocytes B.

Ce travail n'aura pas pour vocation de réaliser un exposé exhaustif sur les différents types de lymphomes et leur prise en charge. Après un rappel sur la technique de l'immunohistochimie, nous évoquerons différentes situations dans lesquelles elle présente un intérêt, avant de présenter les caractéristiques principales du CD20. Dans un second temps, une partie expérimentale sera présentée. Il s'agira d'établir différents aspects de l'expression du CD20 au sein des tissus lymphoïdes sains, réactionnels, et lymphomateux du chien et du chat par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps polyclonal PA5-16701.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I – IMMUNOHISTOCHIMIE : GENERALITES ET TECHNIQUE

1) Généralités

L'immunohistochimie fait aujourd'hui partie du panel de techniques utilisées en routine en diagnostic et pathologie vétérinaire. Cette technique, développée par Albert Coons en 1941, permet de détecter la présence d'antigènes membranaires ou cytoplasmiques (Coons, Creech and Jones, 1941). Elle est utilisée dans le diagnostic et la caractérisation des néoplasies, mais aussi plus généralement en recherche fondamentale pour identifier la répartition de certains marqueurs au sein des tissus. Cette technique peut également être utilisée pour marquer le Ki67, un indice de prolifération permettant d'évaluer le grade d'un phénomène néoplasique (Valli *et al.*, 2016).

La technique d'immunohistochimie repose sur la reconnaissance d'antigènes par des anticorps, formant ainsi des complexes visualisés grâce à différentes méthodes de révélation.

La méthode comporte ainsi trois éléments principaux : la préparation contenant l'antigène à étudier, un anticorps spécifique de l'antigène recherché, et un système de révélation permettant de visualiser le complexe.

Un protocole d'immunohistochimie comporte généralement les étapes suivantes :

- sélection de l'échantillon
- fixation
- inclusion en bloc de paraffine
- déparaffinage
- réactivation de l'antigène et blocage des réactions endogènes
- application d'un anticorps primaire
- application d'un système de révélation
- visualisation de la réaction immunologique formée
- interprétation

La spécificité d'une réaction d'immunohistochimie repose principalement sur la capacité de l'anticorps primaire à se fixer aux épitopes des antigènes cibles, sans se fixer à des antigènes

non-cibles (réaction croisée). Parallèlement, sa sensibilité découle à la fois des capacités de liaison de l'anticorps primaire à sa cible, des méthodes de révélation utilisées, et ainsi de la capacité de la méthode à détecter de faibles taux de complexes antigènes-anticorps parmi les tissus environnants.

2) Importance de la fixation

L'étape initiale de fixation des tissus à analyser est essentielle : en effet, elle permet de prévenir l'autolyse, préserver la structure cellulaire et faciliter le marquage. De nombreux agents de fixation existent, le principal étant le formaldéhyde, qui est un très bon préservateur des organites. Le formaldéhyde est utilisé couramment en histologie de par son faible coût et sa fiabilité (Ramos-Vara, 2005). Il présente toutefois quelques désavantages : son efficacité est grandement dépendante de sa concentration et de son pH, et il a tendance à altérer la structure tertiaire et quaternaire des protéines, voire de modifier certains épitopes. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de fixateur suffisamment performant et accessible pour le remplacer (Raskin and Meyer, 2016).

On recommande généralement une fixation de 16 à 32 heures dans du formaldéhyde à 10% (la fixation complète étant atteinte en 24 à 48 heures en moyenne). Il est essentiel de respecter ce temps de contact afin d'obtenir une réaction optimale : une sous-fixation comme une sur-fixation risquent d'altérer les résultats obtenus à la fin du processus (Valli *et al.*, 2016).

Suite à cette étape de fixation, les échantillons sont généralement inclus en blocs de paraffine dans un but de stockage à plus ou moins long terme. Ils peuvent par la suite être déparaffinés afin de passer à l'étape de réactivation de l'antigène

3) Réactivation de l'antigène et blocage des réactions endogènes

Comme mentionné précédemment, la fixation dans le formaldéhyde a tendance à modifier la structure des protéines, rendant parfois certains antigènes indétectables par les anticorps. Le

formaldéhyde modifie également la charge électrostatique de certaines protéines, qui est pourtant indispensable à la liaison anticorps-antigène (Raskin and Meyer, 2016).

L'étape de réactivation de l'antigène a ainsi pour but d'annuler les changements produits pendant la fixation. On utilise à l'heure actuelle deux méthodes principales de réactivation d'antigène :

- Utilisation d'enzymes protéolytiques (pronase, trypsine, protéinase K...)
- Immersion dans du tampon à une haute température, qui est aujourd'hui la méthode la plus utilisée (Ramos-Vara, 2005).

On profite également de cette phase pour réaliser le blocage de réactions endogènes pouvant potentiellement altérer les résultats. Cette étape est particulièrement importante pour réduire le bruit de fond lié à des enzymes présentes naturellement dans les échantillons étudiés (peroxydase endogène, phosphatase alcaline endogène, activité avidine-biotine endogène...).

4) Choix des anticorps utilisés

a. Structure et propriétés des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines sécrétées naturellement par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes, et présentes dans le sérum. On les nomme également immunoglobulines (Ig). Les anticorps sont composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères, reliées par des ponts disulfures et des liaisons non covalentes, et divisées en 3 régions principales (Figure 1) :

- deux fragments Fab formant des « bras », qui contiennent les régions hypervariables appelées CDR (*complementarity-determining regions*), responsables de la reconnaissance d'antigènes spécifiques (Gómez Román, Murray and Weiner, 2013).

Chaque fragment Fab est composé d'une portion variable et d'une portion constante, chacune formée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. On observe donc pour chaque fragment Fab : une chaîne *constant heavy* CH1, une chaîne *constant light* CL, une chaîne *variable heavy* VH, et une chaîne *variable light* VL.

- un fragment appelé Fc, composé du reste des chaînes lourdes (CH2 et CH3), qui est promoteur de mécanismes immunologiques tels que l'activation des cellules natural killers, l'activation de la voie classique du complément, ou la phagocytose (Lipman *et al.*, 2005).

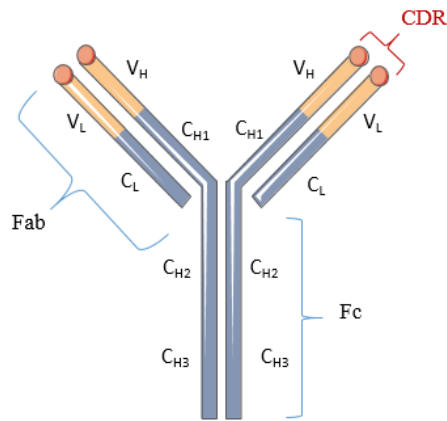


Figure 1 : Structure générale d'un anticorps. D'après (Gómez Román, Murray and Weiner, 2013)

Chaque anticorps possède ainsi des propriétés intrinsèques qui lui sont propres.

- **Sensibilité et spécificité :**

La sensibilité d'un anticorps correspond à sa capacité à détecter la présence de sa cible dans un milieu et s'y fixer.

Parallèlement, la spécificité d'un anticorps représente sa capacité à reconnaître et se lier à sa cible en présence d'autres antigènes, sans se lier à ces derniers. Un anticorps présentant une forte spécificité permet ainsi d'obtenir moins de réactions croisées (Ramos-Vara and Borst, 2016). C'est cette caractéristique qui est particulièrement recherchée dans le cadre d'un protocole d'immunohistochimie.

- **Affinité et avidité :**

L'affinité d'un anticorps correspond à l'expression thermodynamique de la force de liaison de cet anticorps à un épitope monovalent donné. Elle représente la quantité de complexes anticorps-antigènes formés à l'équilibre. Des anticorps à haute affinité peuvent ainsi se lier à plus d'antigènes en un temps d'incubation plus court, et peuvent être utilisés de manière

générale avec une concentration plus faible que des anticorps à faible affinité (Ramos-Vara and Borst, 2016).

On caractérise également les anticorps par leur avidité : elle mesure la force de liaison entre l'anticorps et des antigènes présentant de multiples épitopes (Lipman *et al.*, 2005). L'avidité résulte d'une combinaison entre l'affinité de l'anticorps pour l'épitope cible, le nombre de sites de fixation, et la géométrie du complexe anticorps-antigène formé.

Idéalement, afin d'optimiser les résultats en immunohistochimie, on cherche à utiliser un anticorps reconnaissant un seul antigène sur des tumeurs d'un seul type identifié, avec une forte spécificité et une forte affinité pour l'antigène d'intérêt. Cet anticorps ultraspécialisé n'existant pas à l'heure actuelle, le choix d'un anticorps pour utiliser une technique de laboratoire doit se faire en considérant toutes les propriétés détaillées précédemment.

Il existe actuellement deux catégories principales d'anticorps utilisés dans les techniques de laboratoire : les anticorps polyclonaux et monoclonaux (Ramos-Vara, 2005), qui sont détaillés dans le Tableau 1 suivant.

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps polyclonaux et monoclonaux

	Anticorps polyclonaux	Anticorps monoclonaux
Sensibilité	Elevée	Faible à modérée
Spécificité	Faible à élevée	Elevée
Epitope reconnu	Multiplés épitopes	Un seul épitope
Homogénéité des lots	Variations fréquentes entre les lots produits	Homogénéité de tous les lots produits
Coût	Faible	Elevé
Temps de production	Rapide	Lent

b. Anticorps polyclonaux

Les anticorps dits « polyclonaux » (Pabs) sont des anticorps produits à partir de différentes cellules B, qui reconnaissent ainsi plusieurs épitopes d'un même antigène.

- **Propriétés :**

Les anticorps polyclonaux possèdent une plus forte affinité et une plus faible spécificité que les anticorps monoclonaux. Ils présentent l'avantage d'être capables de se lier à plusieurs épitopes et plusieurs isoformes de l'antigène cible. Leur grande sensibilité leur permet de détecter des épitopes présents en faibles quantités dans un échantillon, grâce à la multiplicité des épitopes reconnus pour un antigène donné.

Cependant, un antisérum polyclonal (produit initial lors du processus de fabrication de ces anticorps) contient plusieurs anticorps différents capables de se lier à la cible, mais également des anticorps peu intéressants qui peuvent être présents à de fortes concentrations si le sérum n'est pas correctement purifié. Les anticorps polyclonaux offrent ainsi la possibilité d'augmenter la probabilité de détecter un antigène, mais présentent également un risque élevé de réaliser des réactions croisées avec des antigènes aléatoires, créant ainsi du bruit de fond.

- **Production :**

Les anticorps polyclonaux sont peu onéreux et rapides à produire (environ 4 à 8 semaines), grâce à une technique simple (Figure 2). L'antigène de choix (ainsi que des adjuvants immunogéniques) est inoculé à l'animal choisi, induisant une réponse immunitaire ciblée contre cet antigène grâce aux lymphocytes B. Un prélèvement sanguin est ensuite réalisé afin de prélever le sérum de l'animal, pour récupérer les immunoglobulines dirigées contre l'antigène d'intérêt. Cet antisérum est ensuite purifié afin de limiter les réactions croisées (Leenaars and Hendriksen, 2005).

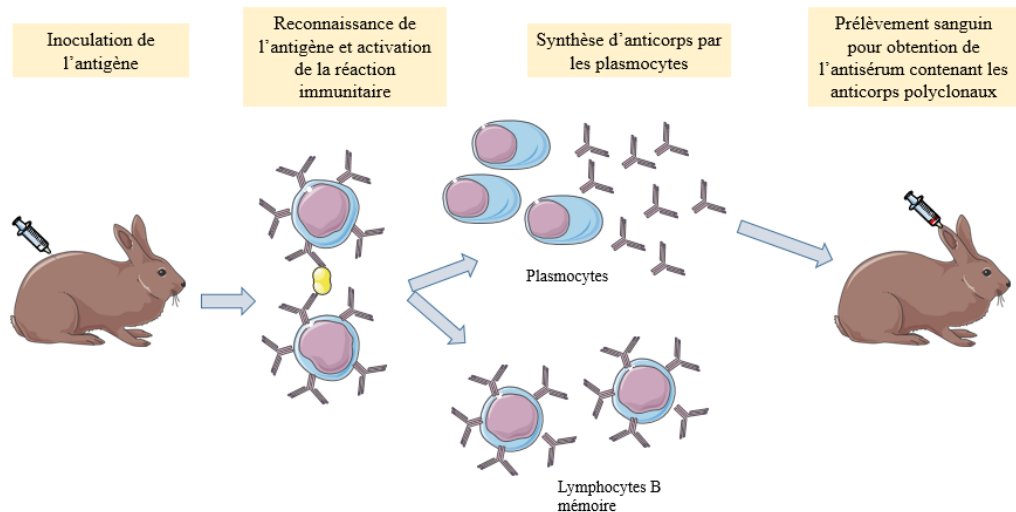


Figure 2 : Processus de fabrication des anticorps polyclonaux. D'après (Parker et al., 2016)

Les anticorps polyclonaux peuvent être produits à partir de nombreuses espèces (souris, lapin, chèvre, cheval, poule...). Le lapin est actuellement l'espèce la plus couramment utilisée (Ramos-Vara and Borst, 2016). On utilise généralement la chèvre ou le cheval lorsque les quantités à produire sont importantes. Dans la mesure du possible, on cherche à choisir une espèce productrice phylogénétiquement éloignée de l'animal présentant les antigènes, afin d'optimiser l'intensité de la réponse immunitaire produite (Leenaars and Hendriksen, 2005). Les anticorps polyclonaux sont globalement très stables et peu sensibles aux changements environnementaux.

c. Anticorps monoclonaux

Inversement, les anticorps monoclonaux (mAb) sont des anticorps produits à partir d'une unique cellule B, et ne se lient ainsi qu'à un seul épitope donné.

▪ Propriétés :

De par leur mode de production, les anticorps monoclonaux sont très spécifiques, permettant ainsi de minimiser le risque de réactions croisées.

Cette propriété peut toutefois se révéler être un désavantage dans certains cas : une légère modification de l'épitope dans le tissu à analyser peut rendre la réaction anticorps-antigène impossible. Inversement, il est possible de tirer profit de cette propriété pour l'étude des modifications structurales ou de l'état de phosphorylation d'un antigène (Lipman *et al.*, 2005).

▪ **Production :**

Les anticorps monoclonaux sont plus onéreux et plus longs à produire (environ 3 à 6 mois), et sont globalement plus sensibles aux conditions de stockage que les anticorps polyclonaux (Leenaars and Hendriksen, 2005). Ils sont produits grâce à la technique des hybridomes développée par César Milstein et Georges Köhler en 1975 (Köhler and Milstein, 1976).

Les hybridomes sont des cellules sécrétrices d'anticorps, produites grâce à la fusion de lymphocytes B provenant d'un animal exposé à l'antigène cible, et d'une lignée cellulaire immortalisée d'un myélome murin (Ramos-Vara, 2005). Après de nombreuses étapes de sélection et de purification, on obtient des lignées d'hybridomes strictement identiques, qui peuvent ainsi devenir une source quasi-infinie d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un seul épitope. Par la suite, ces anticorps sont généralement cryopréservés et purifiés avant d'être stockés (Figure 3).

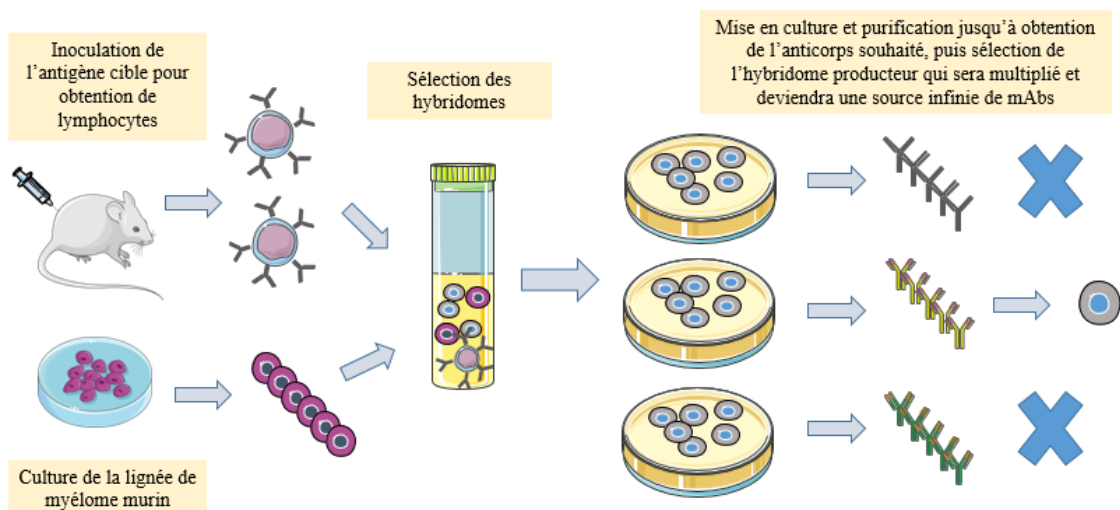


Figure 3 : Processus de fabrication des anticorps monoclonaux. D'après (Parker *et al.*, 2016)

Les anticorps monoclonaux sont le plus souvent produits à partir de souris. Les anticorps monoclonaux produits chez le lapins sont en forte expansion en médecine humaine, car ils présentent les avantages d'avoir une plus forte affinité que ceux produits chez la souris, et ne nécessitent pas d'étape de réactivation d'antigène (Ku, Kass and Christopher, 2017). Cependant, on les utilise peu en médecine vétérinaire : en effet, ils ne se fixent pas correctement sur les tissus animaux, et ne permettent pas d'obtenir de résultats significativement meilleurs justifiant leur utilisation préférentiellement aux anticorps polyclonaux (Vilches and Ramos, 2005; Reid *et al.*, 2007).

5) Systèmes de révélation

Comme mentionné précédemment, la réaction immunohistochimique peut être divisée en deux étapes : tout d'abord une réaction antigène-anticorps, qui est ensuite mise en évidence par un système de révélation. Il existe à l'heure actuelle de nombreux systèmes de révélation, dont les plus courants utilisent des enzymes telles que la peroxydase ou la phosphatase alcaline (Ramos-Vara and Borst, 2016).

La sensibilité d'une réaction d'immunohistochimie repose entre autres sur la détectabilité du système utilisé. On classe les systèmes de détection en méthodes directes et indirectes.

a. Immunohistochimie directe

Les tissus sont mis en contact avec un anticorps directement couplé à un marqueur (le plus souvent un fluorochrome) qui permet la révélation (Figure 4). Ce système est peu utilisé actuellement. Cette méthode est rapide et assez spécifique, mais peu sensible.

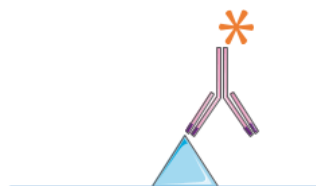


Figure 4 : Immunohistochimie directe

b. Immunohistochimie indirecte

Comme pour l'immunohistochimie directe, on commence en mettant en contact un anticorps primaire avec les tissus à analyser. On applique ensuite un deuxième élément qui viendra se fixer sur l'anticorps primaire et permettre la révélation grâce à différents mécanismes (Figure 5). Cette technique présente une meilleure sensibilité que l'immunohistochimie directe (Ramos-Vara, 2005).

i. Méthodes enzyme-anti-enzyme (PAP ou APAAP)

Pour cette technique, un anticorps tertiaire (de la même espèce que l'anticorps primaire) est lié à un anticorps secondaire, fixé lui-même sur l'anticorps primaire ayant réagi dans le tissu (Ramos-Vara, 2005). Cet anticorps tertiaire est associé à une enzyme (peroxydase pour la méthode PAP, phosphatase alcaline pour la méthode APAAP), formant ainsi un complexe stable qui permettra la révélation (complexe peroxydase-anti-peroxydase ou complexe phosphatase alcaline-anti-phosphatase alcaline). Cette méthode présente une sensibilité légèrement inférieure aux autres (Sternberger *et al.*, 1970; Bratthauer, 1999).

ii. Méthode (strept)avidine-biotine ou (S)ABC

Il s'agit d'une méthode fréquemment utilisée actuellement.

Un anticorps primaire est d'abord mis en contact avec les tissus étudiés, puis on ajoute un anticorps secondaire biotinylé qui vient se fixer sur l'anticorps primaire (Ramos-Vara, 2005). Parallèlement, de la peroxydase biotinylée est incubée avec de l'avidine (une glycoprotéine extraite de l'albumine, avec qui la biotine se lie de manière quasi-irréversible) ou de la streptavidine, formant ainsi un complexe (strept)avidine-biotine-peroxydase. Lors de la mise en contact des deux éléments, le complexe vient alors se fixer sur l'anticorps secondaire biotinylé.

L'utilisation de la streptavidine permet d'éviter des liaisons non spécifiques pouvant créer un bruit de fond dû aux biotines endogènes.

De plus, les biotines possèdent toujours des sites de fixation libres après cette réaction et peuvent se conjuguer entre elles, créant ainsi un très gros complexe d'amplification, et une détection plus simple. Cette technique est relativement longue à mettre en œuvre, mais présente une très forte sensibilité.

iii. Méthode LSAB

Cette technique repose sur le même principe que la technique (S)ABC, mais ici la streptavidine est conjuguée directement à la peroxydase, sans biotine (Ramos-Vara, 2005).

Pour ces deux méthodes ((S)ABC et LSAB), il est ensuite possible réaliser une amplification par la tyramide biotinylée afin d'obtenir un meilleur signal. En effet, en présence de peroxydase et d'eau oxygénée, la tyramide devient active et peut se lier à des acides aminés riches en électrons. Ainsi, la fixation de molécules biotinylées supplémentaires sur le site de la réaction de base permet d'amplifier le signal (mais augmente le bruit de fond). Il devient donc possible de détecter de faibles quantités d'antigènes et d'augmenter les performances des anticorps utilisés.

iv. Méthode polymère

Pour cette méthode, on utilise des polymères de grande (EnVision™ Systems) ou petite (ImmPRESS™ polymerized reporter enzyme staining system) taille, liés à un anticorps secondaire, ce qui amplifie considérablement le signal une fois lié à l'anticorps primaire. Cette méthode permet également d'obtenir une meilleure sensibilité, une réduction des liaisons non spécifiques et du bruit de fond, et peut permettre la coloration simultanée de deux antigènes différents. Le protocole est également simplifié (Wiedorn *et al.*, 2001).

Selon une étude de 2006, le polymère ImmPRESS™ semblerait permettre une plus forte intensité de marquage que le polymère EnVision™ pour un certain nombre d'antigènes étudiés, à un coût inférieur. Cependant, il semble également produire un bruit de fond supérieur à son concurrent (Ramos-Vara and Miller, 2006).

v. Méthode sonde-polymère

Cette technique consiste à mettre en contact un anticorps primaire avec les tissus analysés, puis une sonde peptidique qui vient se fixer sur cet anticorps. Des complexes anticorps-sondes similaires à la technique précédente sont ensuite ajoutés et viennent se fixer sur la sonde pour amplifier le signal.

vi. Technologie PLA (proximity ligation assay) Duolink®

Cette technique permet d'obtenir une sensibilité très élevée grâce à une très forte amplification du signal.

Pour cela, on utilise tout d'abord deux anticorps primaires issus d'espèces différentes et reconnaissant des épitopes différents (sur le même antigène ou deux antigènes proches dans l'espace). On ajoute ensuite des anticorps secondaires couplés à des brins d'ADN. Ces brins d'ADN sont ensuite hybridés pour former une boucle d'ADN, qui sera fortement amplifiée (jusqu'à 1000 copies de la boucle initiale). Des sondes marquées sont enfin ajoutées et viennent se fixer sur la boucle d'ADN amplifiée, permettent ainsi la visualisation du système. Cette méthode permet d'amplifier considérablement le signal sans augmenter le bruit de fond (Fredriksson *et al.*, 2002).

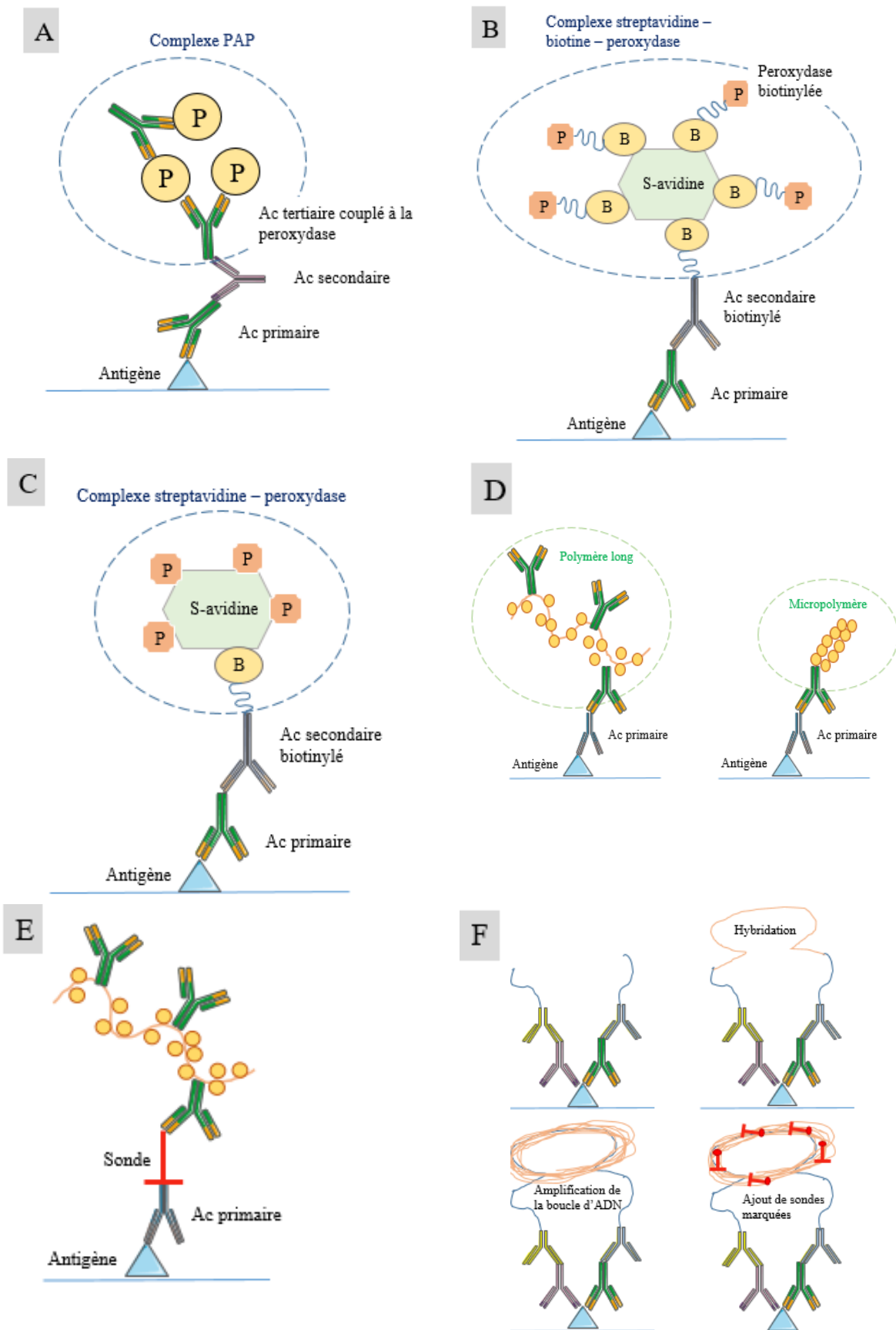


Figure 5 : Techniques d'immunohistochimie indirecte

A : Méthode enzyme-anti-enzyme PAP. B : Méthode SABC. C : Méthode LSAB. D : Méthode polymère. E : Méthode sonde-polymère. F : Technologie PLA.

6) Contrôles

Il est conseillé d'inclure deux types de témoins dans les échantillons analysés grâce à un protocole d'immunohistochimie :

- Un contrôle positif, à l'aide d'un échantillon présentant avec certitude l'antigène considéré (cette information étant obtenue à l'aide d'une autre technique), et dont la localisation au sein de la cellule est identifiée. Le contrôle positif idéal devra présenter une distinction nette entre des zones fortement marquées, et des zones peu ou non marquées.
- Un contrôle négatif, grâce à des tissus dont on sait qu'ils ne présentent pas l'antigène recherché, ou grâce à l'utilisation d'un anticorps non spécifique de l'antigène recherché. L'objectif du contrôle négatif est d'évaluer la présence de réactions non-spécifiques de l'antigène recherché à l'origine de bruit de fond.

Ces deux témoins doivent subir le même protocole que toutes les autres lames analysées afin de pouvoir être interprétés correctement.

7) Limites de l'immunohistochimie et techniques complémentaires

a. Limites de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie présente cependant quelques limites. On observe notamment un manque de standardisation des protocoles et des contrôles entre tous les laboratoires utilisant cette technique, conduisant ainsi à un manque de reproductibilité. De plus, l'interprétation des résultats des marquages est relativement subjective, et conditionnée par l'expérience de l'observateur. Enfin, il est courant de rencontrer différents types d'anomalies de marquage, notamment :

- Un marquage insuffisant : lié en général à un protocole inadapté (quantité de tampon trop importante, incubation insuffisante) (Dabbs, 2002; Fetsch and Abati, 2004)...

- Du bruit de fond ou un marquage faussement positif. De nombreuses causes peuvent expliquer ce type d'anomalies : mauvais blocage des protéines du sérum, tissu nécrotique, cellules détruites, mauvaise fixation, mauvais blocage des réactions endogènes, concentration d'anticorps primaire inadaptée, échantillon trop épais (Brown, 2001; Dabbs, 2002)...

Ainsi, malgré son efficacité, l'immunohistochimie n'est souvent pas utilisée seule, mais en association avec d'autres techniques de laboratoire, que nous allons aborder rapidement ici.

b. Diagnostic cytologique

L'analyse immunohistochimique, notamment dans le processus de diagnostic d'un lymphome, doit notamment toujours être associée à une analyse morphologique. Cette analyse peut être réalisée sur du matériel histologique (comme un prélèvement de nœud lymphatique) ou cytologique (comme une cytoponction à l'aiguille fine).

Lors de l'examen des échantillons, il est important de prendre en compte (Raskin, 2016b; Zandvliet, 2016) :

- Le pourcentage de cellules présentant une morphologie semblant néoplasique
- La taille de ces cellules : on qualifie généralement les cellules néoplasiques de « grandes » lorsque le diamètre de leur noyau est supérieur ou égal à deux fois le diamètre d'une hématie. Elles sont qualifiées de « petites » dans le cas contraire.
- Les caractéristiques du noyau des cellules tumorales : forme, taille, contour, rapport nucléo-cytoplasmique, chromatine plus ou moins condensée, aspect et forme du ou des nucléole(s)...
- Les caractéristiques du cytoplasme : couleur, volume, vacuoles, granulations...
- Les stades de mitose afin de déterminer l'index mitotique et donc le grade de la tumeur
- La présence de macrophages à corps tingibles et de corps lympho-glandulaires
- La vascularisation
- La présence ou non de foyers de nécrose au sein d'un tissu

Dans une étude publiée en 2016, Ku *et al.* ont analysé la concordance entre la cytologie et l'histologie dans le diagnostic des néoplasies sur des échantillons de nœuds lymphatiques de chiens et de chats. Pour les 367 cas étudiés, le diagnostic était similaire entre cytologie et histologie dans uniquement 65% des cas chez le chat, et 80% chez le chien pour la globalité des pathologies étudiées. Cette étude portait sur une diversité de néoplasies rencontrées dans les nœuds lymphatiques et pas uniquement les lymphomes, mais témoigne de la difficulté du diagnostic par cytologie seule (Ku, Kass and Christopher, 2017).

Toutes espèces confondues, il a été déterminé dans cette étude qu'il existait une probabilité d'environ 26% de passer à côté d'un diagnostic de lymphome B et 63% pour un lymphome T, sur la seule base d'une analyse cytologique. Il est soupçonné que l'analyse cytologique seule sous-estime la prévalence des lymphomes du chat, et particulièrement des lymphomes digestifs (dans cette étude, 50% de ces lymphomes ne sont pas diagnostiqués sur la base d'une analyse de cytoponction de nœud lymphatique mésentérique).

Ainsi, cette technique qui présente l'avantage d'être techniquement simple à mettre en place ne permet pas d'obtenir un diagnostic de certitude en l'utilisant seule. Il est donc important de l'associer à d'autres techniques telles que l'histologie et l'immunohistochimie dans le cadre d'une suspicion de processus tumoral.

c. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de détecter des antigènes à l'intérieur et l'extérieur des cellules. Cette technique est le plus souvent utilisée sur des prélèvements sanguins, mais il est également possible de l'utiliser sur de la moelle osseuse, des liquides d'épanchements, du liquide céphalo-spinal, ou toute suspension cellulaire correctement préservée.

L'échantillon à tester est mis en contact avec des anticorps marqués grâce à des fluorochromes. Les cellules passent ensuite individuellement devant des détecteurs de fluorochromes, qui permettent d'identifier la taille et la structure (notamment la granulosité) de chaque cellule, ainsi que son intensité de fluorescence suite au marquage. Un graphique appelé cytogramme est ensuite établi en classant les cellules analysées dans des sous-populations cellulaires (Figure 6). Ainsi, on peut dans un premier temps différencier les lymphocytes au sein de la

population leucocytaire et réaliser un comptage cellulaire (Ramos-Vara, Avery and Avery, 2016).

Cette méthode permet par la suite d'identifier les phénotypes B ou T parmi les lymphocytes mis en évidence, grâce à leur marquage par des anticorps spécifiques de *clusters de différenciation*.

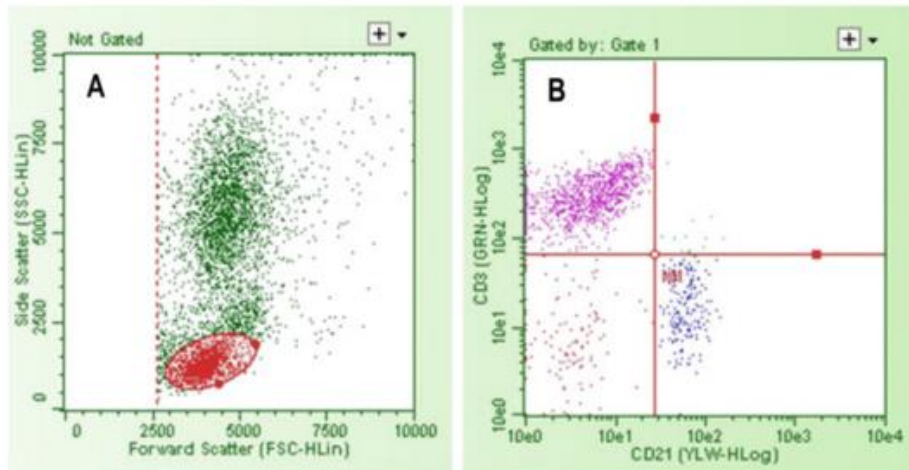


Figure 6 : Exemple d'un cytogramme de sang normal de chien.

A : Repérage du groupe cellulaire d'intérêt d'après sa taille et sa granulosité. B : Double marquage pour discriminer les lymphocytes B (CD21+, 78%) et T (CD3+, 12.6%). (Papakonstantinou et al., 2013)

La cytométrie en flux présente quelques avantages : sa rapidité d'exécution, la possibilité d'analyser plusieurs paramètres simultanément et de réaliser une analyse quantitative des populations cellulaires. Cependant, cette méthode est particulièrement sujette aux artefacts et nécessite de nombreux contrôles pour éliminer les faux positifs. De plus, elle nécessite une forte cellularité dans l'échantillon utilisé pour pouvoir obtenir des résultats fiables. Enfin, l'échantillon testé devant être en suspension, il est impossible d'observer l'architecture des tissus grâce à cette méthode, qui est alors souvent complétée par de l'immunohistochimie.

d. Test de clonalité ou PARR

Le test de clonalité ou PARR (*PCR for antigen receptor rearrangements*) correspond à l'amplification d'une séquence spécifique des lymphocytes codant pour les récepteurs aux antigènes (région CDR3 ou *Complementary Determining Region 3*).

Lors de leur différenciation, les lymphocytes B et T subissent des réarrangements de gènes dans la région CDR3. Pendant ce processus de recombinaison, entre 5 et 20 nucléotides aléatoires sont ajoutés entre chaque segment de gènes, créant une vaste diversité génétique (Burnett *et al.*, 2003). Le processus néoplasique débutant généralement après que la cellule ait subi ces réarrangements de récepteurs, toutes les cellules filles possèdent alors la même région CDR3, et seront détectées par PCR comme une population monoclonale. Inversement, au cours d'une prolifération normale de lymphocytes sains réactionnels, on obtient une grande diversité de clones (Burkhard and Bienzle, 2013).

Ainsi, on observe une population polyclonale de lymphocytes lors d'une réaction inflammatoire, et une population monoclonale dans les processus néoplasiques (Couraud, 2016). Par conséquent, on utilise généralement le test de clonalité dans un contexte d'infiltration lymphoïde marquée, pour faire la distinction entre un état réactionnel et un état lymphomateux (par exemple entre une maladie inflammatoire chronique intestinale et un lymphome digestif de bas grade) lorsque les modifications architecturales sont insuffisantes pour réaliser un diagnostic histologique.

D'un point de vue pratique, la technique consiste à utiliser des sondes qui s'hybrident de part et d'autre de la région CDR3 afin d'en déterminer précisément la taille. Suite à cette hybridation, une PCR est réalisée deux fois sur le même échantillon, afin de confirmer ou infirmer le résultat obtenu.

Les profils possibles sont présentés dans la Figure 7.

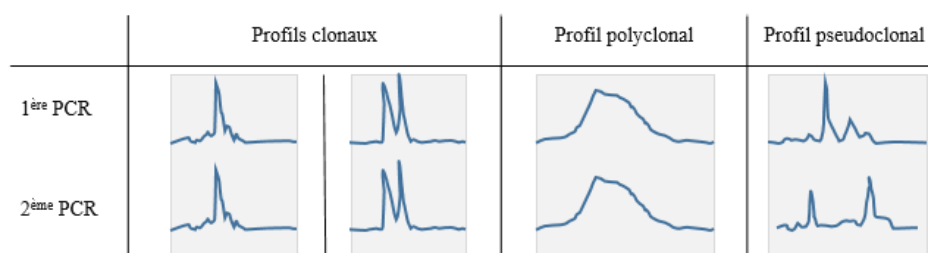


Figure 7 : Différents profils possibles lors d'un test de clonalité. D'après (Bienzle and Vernau, 2011)

- Profil clonal : on observe un (ou plus rarement deux) pic distinct, témoignant d'une population monoclonale, correspondant le plus fréquemment à un profil de lymphome.

- Profil polyclonal : on obtient un grand nombre de pics, formant une courbe d'aspect gaussien une fois lissée. Cette courbe en cloche témoigne d'une population variée de lymphocytes, qui correspond généralement à un processus inflammatoire bénin.
- Profil pseudoclonal et profil non-spécifique : ces profils (courbes significativement différentes entre les deux runs de PCR) correspondent à des défauts de qualité ou quantité d'ADN testé, ou un problème d'hybridation lié à un manque d'affinité de la sonde. Dans ces cas, il est nécessaire de refaire les analyses en adaptant le protocole utilisé (Bienzle and Vernau, 2011).

Le test de clonalité présente le désavantage de donner fréquemment des résultats faussement positifs ou négatifs :

- Profil faussement monoclonal : lors d'une réaction inflammatoire à forte médiation immune, ou lors de maladies infectieuses comme les rickettsioses, ehrlichioses, ou anaplasmoses (Breitschwerdt *et al.*, 1987; Burkhard and Bienzle, 2013)...
- Profil faussement polyclonal : un profil très fortement inflammatoire réactionnel peut cacher un pic correspondant à un processus lymphomateux. Dans ce cas, on peut avoir un profil polyclonal lors d'une analyse initiale, puis un profil clonal révélé quelques temps plus tard après résolution de l'inflammation. Il est également possible d'obtenir un profil faussement polyclonal dans des cas de lymphomes à ADN muté (Fukushima *et al.*, 2009; Moore, Rodriguez-Bertos and Kass, 2012).

Le test de clonalité est une technique moins sensible chez le chat que chez le chien : il permet de détecter correctement entre 65 et 90% des cas de lymphomes canins, contre environ 65% des cas de lymphomes chez le chat (Burnett *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005; Fukushima *et al.*, 2009; Burkhard and Bienzle, 2013).

Cette méthode permet donc de différencier un lymphome d'une lymphadénopathie réactionnelle, mais ne permet pas de réaliser un phénotypage de la population, et est généralement associée à une autre méthode (le plus souvent l'immunohistochimie).

Ainsi, comme nous l'avons vu au sein de cette partie, il existe une grande diversité de méthodes complémentaires utilisées en anatomie pathologique pour l'étude des populations cellulaires. Parmi elles, l'immunohistochimie présente l'avantage incontournable de pouvoir déterminer avec certitude le phénotype des cellules d'intérêt tout en pouvant observer leur localisation *in situ*. Cette technique revêt ainsi un intérêt certain dans le diagnostic et l'étude des pathologies lymphoïdes, et notamment des néoplasies.

II - INTERET DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE DANS L'ETUDE DU TISSU LYMPHOIDE NORMAL ET PATHOLOGIQUE EN MEDECINE VETERINAIRE

1) Classification des lymphomes

a. Généralités

Le lymphome est un désordre lymphoprolifératif tumoral du système immunitaire, au sein d'un ou plusieurs organes. Il s'agit de la tumeur hématopoïétique la plus fréquente chez le chien et le chat, qui représente environ 7 à 10% des néoplasies, et 80 à 90% des tumeurs hématopoïétiques. Contrairement aux leucémies, dans le cas du lymphome la prolifération tumorale débute dans les organes lymphoïdes autres que la moelle osseuse (dans les nœuds lymphatiques la plupart du temps) (Vail and Young, 2007; Valli *et al.*, 2016).

On définit généralement le lymphome comme un ensemble d'entités incluant différents critères anatomiques, morphologiques, immunologiques et moléculaires, et qui dérivent de l'expansion clonale incontrôlée et pathologique de lymphocytes B ou T.

Comme pour toute pathologie, la caractérisation exhaustive d'un cas de lymphome est essentielle afin de disposer de tous les éléments nécessaires à sa prise en charge, autant au niveau de l'arsenal thérapeutique à mettre en œuvre que du pronostic. Idéalement, la classification des lymphomes devrait alors refléter leur variabilité clinique, morphologique, et pronostique.

b. Présentation clinique des lymphomes

Dans un premier temps, que ce soit chez le chien ou chez le chat, on classe généralement les lymphomes en différentes catégories selon leur présentation clinique.

i. Lymphomes du chien

- Forme multicentrique (75 à 85% des cas) : dans ce cas, on observe généralement une atteinte des nœuds lymphatiques périphériques, avec ou sans envahissement des organes abdominaux (Ponce *et al.*, 2010; Vezzali *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2011).
- Forme digestive ou gastro-intestinale (5 à 7% des cas) : cette forme peut prendre l'apparence d'une infiltration isolée, diffuse ou multifocale du tube digestif, accompagnée ou non d'une atteinte des nœuds lymphatiques mésentériques. Elle touche préférentiellement l'intestin grêle (50% des cas de lymphomes digestifs) et l'estomac (25% des cas) (Vezzali *et al.*, 2010; Vail, 2011).
- Forme médiastinale (3 à 5% des cas) : on observe ici une atteinte des nœuds lymphatiques médiastinaux antérieurs et postérieurs, et parfois du thymus (Vail, 2011).
- Forme extra-nodale : (3% des cas environ) cette catégorie rassemble différentes présentations, notamment une forme cutanée (épithéliotrope ou non épithéliotrope), une forme rénale, une forme nasopharyngée, une forme oculaire, et une forme nerveuse (Vail, 2011).

ii. Lymphomes du chat

- Forme alimentaire / digestive / intestinale (jusqu'à 75% des cas suivant les études) : on observe une infiltration intestinale seule ou associée à une infiltration des nœuds lymphatiques mésentériques et du foie. Les lésions touchent préférentiellement l'intestin grêle (50 à 80% des cas, majoritairement jéjunum et iléon) et l'estomac (environ 25% des cas), ainsi que la jonction iléo-caecale et le colon (Vail *et al.*, 1998; Richter, 2003; Gieger, 2011).
- Forme multicentrique (jusqu'à 25% des cas): comme chez le chien, on observe une atteinte des nœuds lymphatiques périphériques. On n'observe le plus souvent pas

d'adénomégalie périphérique généralisée, mais plutôt une adénomégalie interne (Vail *et al.*, 1998; Twomey and Alleman, 2005).

- Forme médiastinale (jusqu'à 15% des cas) : de même que chez le chien, cette forme touche les nœuds lymphatiques médiastinaux et sternaux, ainsi que le thymus (Vail *et al.*, 1998; Fabrizio *et al.*, 2014).
- Forme extra-nodale : on retrouve préférentiellement des atteintes rénales (3 à 10% des cas), mais aussi des atteintes nasopharyngées, oculaires, rétrobulbaires, cutanées, et du système nerveux central. (Vail *et al.*, 1998)

c. Stades cliniques

De plus, on classe conventionnellement les lymphomes selon différents stades cliniques (Vail, 2011) :

- Stade I : atteinte limitée à un ganglion lymphatique ou tissu lymphoïde d'un seul organe (à l'exclusion de la moelle osseuse)
- Stade II : atteinte de nombreux ganglions lymphatiques d'une région
- Stade III : atteinte lympho-ganglionnaire généralisée
- Stade IV : atteinte de la rate et du foie
- Stade V : manifestations sanguines et atteinte de la moelle osseuse et/ou d'autres systèmes organiques

Chaque stade se subdivise en 2 groupes : a (sans signes cliniques), b (avec signes cliniques).

d. Evolution de la classification histologique des lymphomes

Au fil des années, différents groupes ont tenté d'établir une classification histologique des lymphomes animaux, le plus souvent par adaptation de la classification des lymphomes humains, grâce aux nombreuses similarités présentes entre espèces.

En 1871, Theodore Billroth fut le premier à utiliser le terme « lymphome » (Parodi, 2001). De par l'avancée des connaissances scientifiques, la classification s'est ensuite développée et

complexifiée au fil des années, toujours en adaptant la classification issue de la médecine humaine aux lymphomes animaux. Gall et Mallory furent les premiers à établir une classification des lymphomes malins en médecine humaine en 1942 (Gall and Mallory, 1942). Une tentative d'adaptation de cette classification aux lymphomes canins fut ensuite réalisée par Bloom et Meyer en 1945 (Bloom and Meyer, 1945).

Quelques années plus tard, en 1966, Rappaport proposa une classification basée à la fois sur la morphologie cellulaire, mais également sur la croissance néoplasique, introduisant l'idée que l'architecture tissulaire possède un facteur pronostique (Rappaport, 1966). Pour chaque type de lymphome décrit, il sépara la forme « nodulaire » ou « folliculaire » de la forme diffuse. Cette classification fut utilisée pendant de nombreuses années, et servit de base pour l'établissement de la première classification des tumeurs lymphoïdes établie par la World Health Organization.

Au cours des années 1970, deux nouveaux systèmes furent développés en parallèle : le « concept américain » par Robert Lukes, et le « concept européen » par Karl Lennert. C'est à cette période que les premières distinctions entre lymphomes B et T furent initiées.

- **Classification de Kiel (1974) :**

La classification créée par Lennert *et al.* fut présentée en 1974 sous le nom de classification de Kiel (Parodi, 2001). Elle est basée sur deux concepts : le premier est que les cellules néoplasiques sont les équivalents malins des cellules lymphoïdes normales. Le second est que les cellules tumorales sont temporairement ou définitivement bloquées à différents stades de l'évolution normale des cellules lymphoïdes. Il présente alors un schéma simplifié de la réaction immunitaire permettant de distinguer les cellules B et T, et introduit la notion de pronostic dans sa classification, avec la séparation entre lymphomes de haut grade et de bas grade (Annexe 1).

Cette classification fut utilisée en Europe pendant de nombreuses années, à la fois en médecine humaine et vétérinaire (Teske and Wisman, 1994; Parodi, 2001).

- **Classification de Lukes-Collins (1974) :**

A la même période, Lukes et Collins introduisent le concept de « cellules du centre folliculaire ». Au sein du centre folliculaire normal humain, ils caractérisent 2 types de cellules de type B, en fonction de leurs caractéristiques nucléaires et cytoplasmiques (Annexe 2). Cette

classification n'incluait alors pas le caractère plus ou moins malin de la pathologie (Lukes and Collins, 1974).

- **Working Formulation (1982) :**

En 1982, dans le but de tenter d'harmoniser les propositions de classification précédentes, une étude fut menée au sein de plusieurs institutions internationales (National Cancer Institute, 1982). Cette étude collaborative permit alors de proposer un compromis entre les terminologies utilisées précédemment, tout en introduisant une subdivision entre haut grade, grade intermédiaire, et bas grade. Cependant, cette classification étant fondée sur l'étude des taux de survie et non pas sur une approche fonctionnelle, elle ne séparait pas les lymphomes en type B et T (Annexe 3).

Cette classification fut facilement adaptée dans plusieurs études à l'espèce canine et féline, et fut largement utilisée sur le continent américain (Carter, Valli and Lumsden, 1986; Valli *et al.*, 2000).

- **Classification de Kiel actualisée (1990) :**

La classification actualisée de Kiel, présentée en 1990, permet d'introduire les informations fonctionnelles ou immunophénotypes dans la classification. Cet ajout de critères permet de créer de nouveaux sous-types, notamment dans le groupe des dérivés de cellules T (Annexe 4).

- **Classification REAL-WHO (1997) :**

En 1994, une nouvelle classification est établie dans l'espoir d'établir un consensus entre les classifications adoptées sur le continent américain et européen. Cette classification, appelée REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*) fut publiée par l'International Lymphoma Study Group, et prend en compte la morphologie des cellules tumorales, les lignées cellulaires, leur immunophénotype, leurs caractéristiques génétiques, leur topographie, et les manifestations cliniques de la pathologie. Les pathologies ne sont plus séparées en fonction de leur grade de malignité, mais en fonction de leur comportement biologique et de leur origine. Cette classification permet également de distinguer des néoplasmes de type B ou T présentant la même morphologie ou la même architecture

histologique. Grâce à l'apparition de nombreux marqueurs immunologiques en médecine vétérinaire à cette période, de nouvelles entités font leur apparition.

En 1997, la WHO (World Health Organization) modifie très légèrement cette classification, et permet d'obtenir la classification REAL-WHO largement utilisée à l'heure actuelle (Valli *et al.*, 2016) et présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Classification REAL-WHO utilisée actuellement pour la classification des lymphomes

Type de lymphome	Classification
Lymphomes B	<ul style="list-style-type: none"> - Des lymphocytes B précurseurs : <ul style="list-style-type: none"> o Leucémie/lymphome lymphoblastique B - Des lymphocytes B périphériques/matures : <ul style="list-style-type: none"> o Leucémie lymphocytaire chronique / lymphome lymphocytaire à petites cellules o Leucémie prolymphocytaire à cellules B o Lymphome lymphoplasmocytaire / immunocytome o Lymphome des cellules du manteau o Lymphome folliculaire o Lymphome de la zone marginale o Lymphome diffus à grandes cellules B o Lymphome angiocentrique à cellules B - Lymphome de Burkitt - Burkitt's like - Plasmocytome - Myélome
Lymphomes T/NK	<ul style="list-style-type: none"> - Des lymphocytes T précurseurs : <ul style="list-style-type: none"> o Leucémie/lymphome lymphoblastique T - Des lymphocytes T périphériques/matures : <ul style="list-style-type: none"> o Leucémie lymphocytaire chronique / leucémie prolymphocytaire o Leucémie lymphocytaire à grands lymphocytes granuleux (type T ou NK) o Mycosis fungoïdes / syndrome de Sezari o Lymphome T périphérique (extranodal) o Leucémie/lymphome T de l'adulte o Lymphome angioimmunoblastique o Lymphome angiotropique o Lymphome T intestinal o Lymphome T hépatosplénique o Lymphome T à grandes cellules anaplasiques o Lymphome T panniculite-like
Autres	<ul style="list-style-type: none"> - Tumeur mastocytaire - Lymphome Hodgkin-like - Thymome malin

En médecine humaine, l'application de cette classification fut testée lors d'une étude sur environ 1400 cas de lymphomes et leucémies, permettant d'obtenir un consensus sur 85% des cas parmi 5 experts en hématopathologie. Ces résultats exceptionnels permettent alors d'établir la supériorité de cette classification sur celles existant précédemment (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

Une étude fut par la suite menée par Valli et al en 2011 afin de tester l'applicabilité de cette classification au lymphome canin (Valli *et al.*, 2011). Vingt vétérinaires expérimentés (mais non spécialistes en hématopathologie) étudièrent alors 300 cas de lymphomes canins. Cette étude démontra un consensus général de 83% entre le panel de pathologistes et le gold standard, avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 99%. Pour les six entités les plus communes, le consensus global était alors de 87%, avec une sensibilité de 77% et une spécificité de 96%. Cette publication permit de prouver que la classification REAL-WHO est adaptée pour classer les lymphomes canins avec une grande précision, même par des individus ne possédant pas une expérience de spécialiste dans le domaine.

e. Détermination du grade histologique

La détermination du grade histologique est un élément important dans la détermination du pronostic après un diagnostic de lymphome. Pour déterminer ce grade, on utilise le marqueur de prolifération Ki67, une protéine nucléaire exprimée dans les phases actives du cycle cellulaire, donc présente dans les cellules en prolifération. On quantifie généralement ce marqueur dans les tissus d'intérêt grâce à l'immunohistochimie ou la cytométrie en flux. Le pourcentage de Ki67 dans les tissus permet ainsi de déterminer le grade histopathologique du lymphome.

Les différentes études publiées à l'heure actuelle ne permettent pas d'établir de réelles valeurs seuils universelles, mais on considère généralement qu'un lymphome est de bas grade pour un pourcentage de Ki67 inférieur à 20% environ, de grade intermédiaire pour un Ki67 entre 20 et 40-50% et de haut grade pour un pourcentage supérieur à 40-50% (Fournel-Fleury *et al.*, 1997; Sokołowska *et al.*, 2012; Poggi *et al.*, 2017).

On estime qu'environ 75% des lymphomes canins sont de haut grade, et 25% de bas grade (Sözmen *et al.*, 2005; Ponce *et al.*, 2010; Vezzali *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2011).

Chez le chat, environ 10% des lymphomes sont de bas grade, contre environ 35% de grade intermédiaire et 55% de haut grade. Les lymphomes alimentaires du chat dégagent une forte tendance avec 89% des cas de haut grade (Vail *et al.*, 1998; Gabor, Canfield and Malik, 1999; Valli *et al.*, 2000).

f. Intérêt pronostique de la classification

De nombreuses études ont été réalisées afin d'essayer d'établir des facteurs pronostiques chez le chien et le chat. En effet, la caractérisation précise des lymphomes grâce aux différents outils de classification présentés précédemment permet d'obtenir des informations pronostiques et potentiellement d'influencer le choix thérapeutique en fonction du type de lymphome rencontré.

i. Facteurs pronostiques chez le chien

Concernant le signalement de l'animal :

- L'âge, le sexe, et le poids de l'animal n'ont pas d'influence sur le pronostic (Kiupel, Teske and Bostock, 1999; Dobson *et al.*, 2001).

Concernant la localisation du lymphome :

- On obtient les meilleurs résultats chez les chiens à lymphome multicentrique, pour lesquels on obtient une survie d'une semaine à plusieurs années grâce à la chimiothérapie (Dobson *et al.*, 2001).

Concernant la classification du lymphome :

- Plus le stade clinique est avancé au moment du diagnostic, plus le pronostic est sombre. Les stades V ont notamment une médiane de survie significativement plus courte que les stades I à IV (Teske *et al.*, 1994; Jagielski *et al.*, 2002; Vail and Young, 2007).
- De même, les sous-stades b ont une durée de rémission et une survie plus courtes que les sous-stades a (Greenlee *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1994;

Jagielski *et al.*, 2002).

- Le pronostic est plus sombre pour les lymphomes présentant un phénotype à cellules T (qui représentent 10 à 38% des lymphomes du chien), qui ont généralement tendance à avoir un comportement plus agressif, induisent généralement des syndromes paranéoplasiques, un taux de rémission plus faible, et une durée de vie plus courte (Appelbaum *et al.*, 1984; Greenlee *et al.*, 1990; Teske *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Culmsee *et al.*, 2001; Dobson *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2010; Vezzali *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2011).
- Inversement, les lymphomes de type B (soit 60 à 80% des lymphomes du chien) répondent plutôt favorablement à la chimiothérapie et permettent une médiane de survie relativement longue (Appelbaum *et al.*, 1984; Greenlee *et al.*, 1990; Teske *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1995; Culmsee *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2010; Vezzali *et al.*, 2010; Valli *et al.*, 2011).

Concernant le grade du lymphome :

- Les lymphomes de haut grade ont un pronostic plus sombre (malgré une meilleure réponse à la chimiothérapie) que les lymphomes de bas grade (Teske *et al.*, 1994; Ponce *et al.*, 2004).

Concernant les paramètres biologiques :

- L'hypercalcémie elle-même n'a pas d'influence directe sur le pronostic, mais elle est souvent liée à un phénotype à cellules T, et donc un pronostic plus sombre (Greenlee *et al.*, 1990; Vail and Young, 2007).

ii. Facteurs pronostiques chez le chat

Concernant le signalement de l'animal :

- L'âge, le sexe, et la race de l'animal n'ont pas d'influence sur le pronostic (Patterson-Kane, Kugler and Francis, 2004; Waly *et al.*, 2005; Wolfesberger *et al.*, 2017).

Concernant la localisation du lymphome :

- Les lymphomes digestifs semblent entraîner une médiane de survie significativement inférieure aux autres localisations. De même, les lymphomes rénaux entraînent généralement une médiane de survie plutôt faible (3 à 6 mois), tout comme les lymphomes médiastinaux (environ 3 mois) (Vail *et al.*, 1998; Vail, 2011; Sato *et al.*, 2014).
- Les lymphomes nasaux sont globalement de bon pronostic, notamment grâce à l'utilisation de la radiothérapie qui donne d'excellents résultats (Vail *et al.*, 1998; Moore, 2013).

Concernant la classification du lymphome :

- Comme chez le chien, plus le stade clinique est avancé au moment du diagnostic, plus le pronostic est sombre. Le sous-stade a est un critère positif, mais on détecte généralement les lymphomes félins au sous-stade b (Vail and Young, 2007; Wolfesberger *et al.*, 2017).
- Les lymphomes à grandes cellules présentent généralement un taux de survie plus faible que les lymphomes à petites cellules (Moore, Rodriguez-Bertos and Kass, 2012).

- On observe environ 70-75% de lymphomes B contre environ 25 à 30% de lymphomes T (plutôt des lymphomes médiastinaux et intestinaux).

Les lymphomes alimentaires (largement majoritaires chez le chat) sont de type B dans 60 à 75% des cas. Parmi ceux-ci, la majorité des lymphomes gastriques sont de type B, et la majorité de lymphomes intestinaux sont de type T (Gabor, Malik and Canfield, 1998; Gabor, Canfield and Malik, 1999; Waly *et al.*, 2005; Vail, 2011; Moore, Rodriguez-Bertos and Kass, 2012).

Le lien entre type B ou T et durée de survie chez le chat ne fait pas consensus à l'heure actuelle. D'après certaines études, les chats souffrant de lymphomes B riche en cellules T ou de lymphomes T intestinaux présentent une durée de survie significativement plus longue (environ 1.7 ans) que dans les cas de lymphome B

à grandes cellules (environ 4.5 mois) ou les lymphomes T périphériques (6.1 mois environ) (Sato *et al.*, 2014; Wolfesberger *et al.*, 2017). Inversement, certaines publications ne rapportent pas de différences significatives entre les lymphomes de type B et T en termes de survie (Patterson-Kane, Kugler and Francis, 2004).

Concernant le grade du lymphome :

- Tout comme chez le chien, la médiane de survie pour les chats atteints de lymphomes de haut grade est significativement plus faible que dans les lymphomes de bas grade (Sato *et al.*, 2014).

Ainsi, il ressort qu'une part essentielle de la prise en charge d'un lymphome réside dans sa caractérisation précise, et particulièrement la détermination de son immunophénotype et de son grade de malignité.

Pour cela, les différentes techniques présentées dans la partie I peuvent permettre d'établir précisément les caractéristiques d'un lymphome, qui sont essentielles pour déterminer un pronostic et mettre en place un schéma thérapeutique. Leur utilisation ne se limite cependant pas à cette application. En effet, nous allons voir que ces méthodes (et particulièrement l'immunohistochimie) peuvent intervenir dans d'autres situations où la pose d'un diagnostic est essentielle, notamment dans la différenciation entre un processus inflammatoire chronique et un lymphome.

2) Diagnostic différentiel lymphome/hyperplasie

L'hyperplasie est définie comme une prolifération excessive de cellules au sein d'un tissu, qui conservent cependant une morphologie et une fonction normale. Au sein des organes lymphoïdes, ce processus est généralement secondaire à une inflammation, une infection, ou un désordre hormonal (Raskin, 2016a).

Avant d'entamer une quelconque démarche thérapeutique, la première étape consiste à réaliser un diagnostic différentiel entre une simple réaction d'hyperplasie lymphoïde et son équivalent néoplasique (qu'il soit primaire ou métastatique). Pour ce faire, différents critères cytologiques

sont généralement pris en compte (Tableau 3) (Burkhard and Bienzle, 2013; Sapierzyński *et al.*, 2016) :

Tableau 3 : Critères cytologiques de différenciation entre lymphome et hyperplasie réactionnelle

Lymphome	Hyperplasie réactionnelle
<ul style="list-style-type: none"> - Population monomorphe, composée d'au moins 50% (souvent plus de 80-90%) de cellules rondes de souche lymphoïde au même stade de maturation (lymphoblastes ou lymphocytes présentant des atypies) - Rares plasmocytes et cellules inflammatoires 	<ul style="list-style-type: none"> - Moins de 50% (généralement moins de 20%) de la population est composée de lymphoblastes - Présence d'une population hétérogène incluant des lymphocytes de petite taille, de taille intermédiaire, et des lymphoblastes - Présence de plasmocytes et cellules inflammatoires

Ces caractéristiques permettent d'orienter l'observateur, mais de nombreux obstacles s'opposent au diagnostic de certitude : représentativité de l'échantillon, préparation des lames, quantité de matériel observé, niveau d'expertise de l'observateur... Ainsi, des techniques complémentaires sont nécessaires pour affiner le diagnostic.

Les principaux challenges diagnostiques au sein des organes lymphoïdes concernent les nœuds lymphatiques et la rate.

a. Au sein des nœuds lymphatiques

Parmi les cas d'adénomégalies, il s'agit principalement de faire un diagnostic différentiel entre un processus néoplasique de type lymphome (primaire ou métastatique) et des causes bénignes telles qu'une hyperplasie lymphoïde réactionnelle (diffuse ou folliculaire) secondaire à une réaction immunitaire. Pour cela, on réalise généralement dans un premier lieu une cytoponction à l'aiguille fine ou une biopsie d'un nœud lymphatique touché.

Dans les cas de lymphomes, on observe généralement au niveau histologique : un effacement de la structure du nœud lymphatique, une disparition de la polarité des follicules, une infiltration ou un effacement des sinus par la population tumorale, et souvent des zones de nécrose. Inversement, dans les hyperplasies folliculaires, on retrouve généralement une structure et une

polarité conservées des centres germinatifs du nœud lymphatique. L'hyperplasie folliculaire est fréquente dans les nœuds lymphatiques mésentériques : les follicules y sont hypertrophiés (pouvant aller jusqu'à une coalescence de ceux-ci), et les cordons et sinus médullaires contiennent de nombreux plasmocytes matures (Valli, 2007).

Cependant, un nœud lymphatique très fortement réactionnel peut présenter une telle augmentation de sa proportion de lymphoblastes, ou des lymphoblastes de taille tellement augmentée qu'ils suggèrent un lymphome (Tvedten, 2012). Une étude a notamment mis en évidence une hyperplasie lymphoïde transitoire chez de jeunes chats, présentant de grandes similitudes cytologiques avec un lymphome mais probablement secondaire à une infection par le FeLV (Moore *et al.*, 1986).

Enfin, dans les cas de processus métastatiques avec atteinte des nœuds lymphatiques, le diagnostic est suggéré par la présence de cellules inhabituelles présentant des critères de malignité en leur sein. Cependant, ces cellules peuvent être difficiles à identifier parmi les éléments normaux, d'où l'intérêt des techniques complémentaires (Raskin, 2016b).

Ainsi, même si il est établi que la cytologie et l'histologie de nœuds lymphatiques sont des techniques présentant une grande sensibilité et spécificité dans la détection des lymphomes, il est essentiel de confirmer le diagnostic et d'en approfondir la caractérisation à l'aide de techniques additionnelles telles que l'immunohistochimie ou la détermination du Ki67 pour établir convenablement la prise en charge (Bauer, Zervos and Moritz, 2007; Tvedten, 2012; Burkhard and Bienzle, 2013; Seelig *et al.*, 2016).

b. Au sein de la rate

Il existe une diversité de phénomènes néoplasiques ou bénins pouvant mener à une hypertrophie généralisée de la rate ou à des lésions nodulaires focales. Parmi elles, on retrouve notamment l'hyperplasie nodulaire bénigne, le lymphome des cellules du manteau, et le lymphome de la zone marginale, qui entraînent des lésions nodulaires et étaient auparavant regroupées sous le terme de nodule fibrohistiocytaire (Moore *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2013; Sabattini *et al.*, 2018).

Cependant, malgré la fréquence de ces affections, on dispose actuellement de peu de critères de diagnostic histologique ou cytologique standardisés. De plus, le lymphome splénique de la zone

marginale présente une progression très lente et de grandes similarités avec l'hyperplasie bénigne de la zone marginale. Ainsi, le tissu présente souvent des caractéristiques transverses en termes de morphologie et d'architecture, et nécessite un diagnostic à l'aide de techniques complémentaires telles que l'immunohistochimie et le test de clonalité (Stefanello *et al.*, 2011; O'Brien *et al.*, 2013; Fracácio *et al.*, 2018).

3) Diagnostic différentiel lymphome digestif/MICI chez le chat

Chez les chats présentant des troubles digestifs chroniques, après de nombreux examens complémentaires et essais thérapeutiques, le clinicien se retrouve souvent amené à réaliser un diagnostic différentiel entre une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (ou MICI) et un lymphome. Le terme de « MICI » du chat regroupe un ensemble d'affections chroniques idiopathiques du tractus digestif. Elles provoquent des signes cliniques digestifs peu spécifiques, tout comme le lymphome digestif.

Cependant, de nombreuses caractéristiques cliniques, hématologiques, biochimiques, voire même histologiques des lymphomes et des MICI se recoupent, rendant le diagnostic initial compliqué (Al-Ghazlat, De Rezende and Ferreri, 2013; Paulin *et al.*, 2018).

a. Echographie

Un des premiers examens réalisés lors de pathologie digestive est généralement l'échographie abdominale. Cependant, sauf dans des cas présentant des masses identifiables, cet examen se révèle être d'une faible utilité pour établir un diagnostic de certitude. Différentes études ont tenté d'établir les caractéristiques échographiques permettant de différencier une MICI d'un lymphome, avec relativement peu de succès.

En effet, un épaissement diffus de la musculature est rencontrée à la fois dans les MICI et dans les lymphomes intestinaux, et la sensibilité de ce marqueur est variable selon les études : certaines équipes rapportent une association significative entre l'épaissement de la musculature et la probabilité que l'animal présente un lymphome, mais cette affirmation ne fait

pas consensus. La perte de la structure en couches serait un indicateur valide de néoplasie, mais n'est pas systématiquement rencontrée dans tous les lymphomes (Zwingenberger *et al.*, 2010).

Les critères échographiques présentés ne sont donc pas pathognomoniques, et il n'existe pour l'instant aucun intervalle de référence permettant au clinicien non expérimenté d'interpréter les résultats obtenus. Dans tous les cas, la caractérisation échographique seule n'est pas suffisante pour poser un diagnostic.

b. Examen histologique

L'un des examens plébiscités par les cliniciens dans la prise en charge de troubles digestifs chroniques est ensuite souvent la biopsie pour analyse histologique.

Deux modalités de prélèvement existent alors : l'endoscopie ou la laparotomie. L'intérêt de l'examen endoscopique a été prouvé, car il permet d'observer les modifications et lésions de la muqueuse *in situ*, et donc d'obtenir des échantillons correspondants aux zones présentant spécifiquement des lésions. Cependant, l'endoscopie ne permet d'explorer que le tractus intestinal proximal et distal, à l'inverse de la laparotomie qui a l'avantage d'offrir également un accès à d'autres organes tels que le foie ou les nœuds lymphatiques (Willard *et al.*, 2008; Al-Ghazlat, De Rezende and Ferreri, 2013). Il a été prouvé que la localisation des biopsies réalisées par endoscopie influe grandement sur la fiabilité du diagnostic final. En effet, parmi la population testée dans une étude de 2011, on retrouvait énormément de divergences de diagnostic entre des biopsies réalisées au niveau du duodénum ou de l'iléon sur les mêmes animaux (Scott *et al.*, 2011). Ce facteur peut ainsi mener à des erreurs de diagnostic pour peu qu'une seule localisation de biopsie soit prise en compte.

Une fois les échantillons de tissus obtenus, de nombreux challenges s'opposent au diagnostic de certitude.

En effet, il est supposé qu'une inflammation chronique pourrait précéder ou augmenter le risque de développer un lymphome alimentaire (Waly *et al.*, 2005; Paulin *et al.*, 2018). En effet, une MICI concomitante est rencontrée jusque dans 60% des cas de lymphome alimentaire félin selon les études (Carreras *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005; Briscoe *et al.*, 2011; Kiupel *et al.*, 2011). Le lien de causalité entre ces deux affections n'a cependant jamais été prouvé, même s'il est possible qu'elles coexistent au sein d'un même animal (Carrasco *et al.*, 2015). Les tissus

présenteront alors des caractéristiques histologiques ambiguës, rendant le diagnostic encore plus compliqué.

c. Intérêt de l'immunohistochimie

En 2011, Kiupel et son équipe ont réalisé une étude comparative portant sur le diagnostic différentiel entre lymphome digestif félin et MICI en utilisant plusieurs techniques (Kiupel *et al.*, 2011). Tout d'abord, grâce à un examen histopathologique, l'équipe a caractérisé le niveau d'infiltration de la muqueuse par les cellules lymphoïdes (faible à forte densité, répartition de surface ou infiltration des cryptes intestinales...), la répartition de ces cellules (cellule isolée, nids, plaques). Le mono ou polymorphisme de l'infiltrat lymphocytaire, ainsi que la taille des cellules et le nombre de figures de mitose sont également pris en considération dans l'établissement d'un premier diagnostic. Sur ces mêmes lames, un diagnostic a également été réalisé à l'aide des techniques d'immunohistochimie et de PCR.

Parmi les cas étudiés, 26% des cas diagnostiqués comme MICI par histologie ont été reclassés comme lymphomes T suite aux résultats d'immunohistochimie, et jusqu'à 53% en combinant immunohistochimie et PCR. De même, 8% des cas initialement classés comme lymphomes T ont été reclassés comme MICI suite à l'utilisation des deux autres techniques. L'étude histologique seule présentait alors une sensibilité de 72% et une spécificité de 99%. La combinaison histologie/immunohistochimie permettait d'augmenter la sensibilité à 78% (Sp = 99%). L'utilisation des trois méthodes combinées permettait d'obtenir une sensibilité de 83% (Sp = 99%).

Certains paramètres morphologiques ont cependant pu être associés à une spécificité de 100% pour le diagnostic du lymphome : infiltration intravasculaire, infiltration de la séreuse, plaques intraépithéliales de surface, nids et plaques intraépithéliales au niveau des cryptes, et présence de métastases. Il paraît cependant évident que ces observations nécessitent un grand niveau d'expertise en histopathologie et peuvent être subjectives dans des cas compliqués.

En effet, en 2002, une étude a été réalisée parmi un panel de spécialistes diplômés de l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) et de pathologistes expérimentés en histopathologie (dont 4 sur 5 diplômés de l'American College of Veterinary Pathology). Chacun de ces spécialistes a dû établir un diagnostic différentiel entre une maladie

inflammatoire et un phénomène néoplasique sur un nombre donné d'échantillons. Dans plus de la moitié des cas, le diagnostic ne faisait alors pas consensus parmi les examinateurs. Cette non-homogénéité d'opinions a été observée à la fois sur des échantillons provenant de chiens et de chats (Willard *et al.*, 2002).

Ces études renforcent l'affirmation selon laquelle la combinaison de nombreuses techniques (et particulièrement l'immunohistochimie) est essentielle dans l'établissement d'un diagnostic fiable et d'une prise en charge adaptée. L'immunohistochimie permet alors de confirmer le diagnostic de lymphome grâce à la présence d'une infiltration diffuse des tissus par une population monomorphe de lymphocytes (souvent T dans les lymphomes intestinaux). Inversement, dans les cas de MICI, on rencontre typiquement une population polymorphe composée de lymphocytes, plasmocytes, neutrophiles, éosinophiles, et macrophages (Paulin *et al.*, 2018).

Tous ces arguments tendent à prouver que l'examen histopathologique seul n'est pas adapté à la différenciation MICI/lymphome intestinal, et doit être accompagné de techniques comme l'immunohistochimie ou le test de clonalité (Sabattini *et al.*, 2016).

4) Diagnostic différentiel lymphome digestif/IBD chez le chien

Le challenge est le même dans l'espèce canine : il s'agit de différencier les lymphomes digestifs des entérites chroniques (regroupées généralement sous le nom d'IBD, ou *inflammatory bowel disease*, provoquant généralement des diarrhées chroniques non pathognomoniques).

a. Echographie

Chez le chien, les études semblent s'accorder pour dire qu'aucun lien significatif n'a été trouvé entre l'épaisseur du tube digestif et le diagnostic histologique, rendant le diagnostic échographique compliqué (Rudorf *et al.*, 2005).

Seule une étude de 2003 a semblé mettre en évidence une différence dans l'épaisseur totale de l'intestin : en moyenne 0.6cm d'épaisseur dans les cas d'entérite, contre 1.9cm chez les chiens présentant des néoplasies intestinales (Penninck *et al.*, 2003). Toutefois, certains de ces cas de

néoplasies étaient associés à un environnement inflammatoire très important (nécrose, œdème...). Ainsi, il est important de noter que l'interprétation d'un épaissement de la paroi intestinale doit être fait en tenant compte des modifications histologiques environnantes. Cette étude de Penninck rapporte également une fréquence significativement élevée de la perte de la structure en couches de l'intestin dans les phénomènes néoplasiques, contrairement aux cas d'entérite.

b. Examen histologique

Tout comme chez le chat, on retrouve souvent des diagnostics opposés sur des biopsies prélevées sur le duodénum et l'iléon de chiens présentant des entéropathies : sur 30 chiens étudiés dans une étude de 2010, le diagnostic était concordant pour uniquement 8 d'entre eux (soit 27%) (Casamian-Sorrosal *et al.*, 2010). Ainsi, une fois de plus, l'analyse histologique seule (même réalisée par un spécialiste) d'un échantillon peut mener à une erreur de diagnostic.

Au niveau histologique, les pathologistes reposent leur diagnostic sur des critères tels que la perte de la structure en couches et l'invasion profonde (au-delà de la lamina propria, jusqu'à la sous-muqueuse) par une population monomorphe de lymphocytes atypiques pour poser un diagnostic de lymphome. Ces modifications peuvent aller jusqu'à l'effacement des villosités et des cryptes intestinales (Moore, Rodriguez-Bertos and Kass, 2012; Carrasco *et al.*, 2015).

Une fois de plus, un lymphome et une entérite chronique peuvent coexister au sein d'un même individu, et l'infiltrat inflammatoire peut alors masquer des cellules néoplasiques, faussant ainsi le diagnostic final, d'où l'intérêt de techniques complémentaires telles que l'immunohistochimie.

c. Intérêt de l'immunohistochimie

En 2015, une étude visant à comparer les différentes méthodes utilisables pour réaliser un diagnostic différentiel entre lymphome digestif et entérite chronique chez le chien a été réalisée (Carrasco *et al.*, 2015). Cette étude repose sur l'analyse de 32 chiens présentant des troubles digestifs chroniques, sur lesquels de multiples échantillons de duodénums ont été obtenus par endoscopie. Pour chacun de ces cas, un diagnostic différentiel entre entérite chronique et

lymphome a été établi sur simple analyse histologique, puis confirmé ou non par immunohistochimie, puis par une association immunohistochimie/test de clonalité. Pour chaque protocole étudié, l'échantillon est classé comme IBD, suspicion de lymphome, ou lymphome.

Les résultats révèlent que l'immunohistochimie permet la reclassification des cas de « suspicion de lymphome » en lymphome dans 5 cas sur 13 suspects, et en IBD dans un cas. De même, 2 cas initialement classés comme IBD à l'analyse histologique sont reclassés en lymphomes grâce à la combinaison avec l'immunohistochimie. Tous les cas initialement classés comme lymphome sont confirmés, et l'immunohistochimie permet de les caractériser plus précisément comme lymphomes T.

L'association immunohistochimie/PARR a permis par la suite de diagnostiquer correctement les cas de suspicion de lymphomes restants (9 cas d'IBD, 8 lymphomes T).

Des résultats similaires avaient précédemment été présentés dans d'autres publications (Ragaini *et al.*, 2003; Waly *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2006). Ces études renforcent l'affirmation selon laquelle l'immunohistochimie est un élément clé dans le diagnostic des lymphomes et des autres pathologies du système lymphoïde, seule ou en association avec des techniques comme le PARR.

Nous venons de voir qu'il existe un certain nombre de situations ambiguës pour lesquelles l'utilisation de l'immunohistochimie se révèle essentielle à la détermination du diagnostic. Ainsi, afin de parvenir à identifier le phénotype des cellules étudiées, on étudie l'expression de marqueurs spécifiques de différentes classes cellulaires, et notamment les clusters de différenciation tels que le CD20, spécifique des lymphocytes B.

III - LE CD20 : MOLECULE D'INTERET DANS L'ETUDE DES PROCESSUS IMPLIQUANT LES CELLULES B

Les clusters de différenciation (CD) sont des antigènes de surface exprimés par les cellules du système immunitaire, qui permettent de déterminer leur type, leur stade de différenciation, et leur activité. Plus de 360 clusters de différenciation sont identifiés à l'heure actuelle.

Dans la nomenclature, ces marqueurs sont identifiés par un + pour signifier que la population exprime le marqueur, et un – quand elle ne l'exprime pas (par exemple, on peut parler d'une population « CD3+ CD4- CD8- »). Certains CD sont synonymes d'un type cellulaire (on peut par exemple parler de cellules CD3 pour les lymphocytes T, CD4 pour les auxiliaires et les monocytes, ou encore CD8 pour les cellules T cytotoxiques) (Tableau 4). Cependant, la présence d'un marqueur CD à la surface d'une cellule ne détermine pas forcément sa fonction.

Tableau 4 : Liste des clusters de différenciation les plus souvent utilisés pour l'immunophénotypage dans l'étude des pathologies de l'hématopoïèse du chien et du chat (Tvedten, 2012).

Marqueur	Type de cellules correspondant
CD1c	Cellules dendritiques
CD3	Lymphocytes T
CD4	LT-helpers, monocytes, macrophages, granulocytes
CD8	Lymphocytes T cytotoxiques
CD11b	Granulocytes, monocytes, macrophages
CD11c	Monocytes, granulocytes, cellules dendritiques
CD11d	Macrophages, granulocytes
CD14	Monocytes, macrophages
CD18	Leucocytes
CD20	Lymphocytes B
CD21	Lymphocytes B matures
CD34	Blastes
CD45	Leucocytes
CD79a	Lymphocytes B

Le CD20 est une protéine de surface de type cluster de différenciation située à la surface des lymphocytes B. Il s'agit d'une phosphoprotéine non glycosylée qu'on retrouve à la surface des cellules pré-B, B immatures, et B matures (Figure 8). Chez l'Humain, il est supposé que le CD20 soit perdu lors de la différenciation des lymphocytes B matures en plasmocytes (Jubala *et al.*, 2005). Son expression sur les plasmocytes animaux est mal connue à l'heure actuelle.

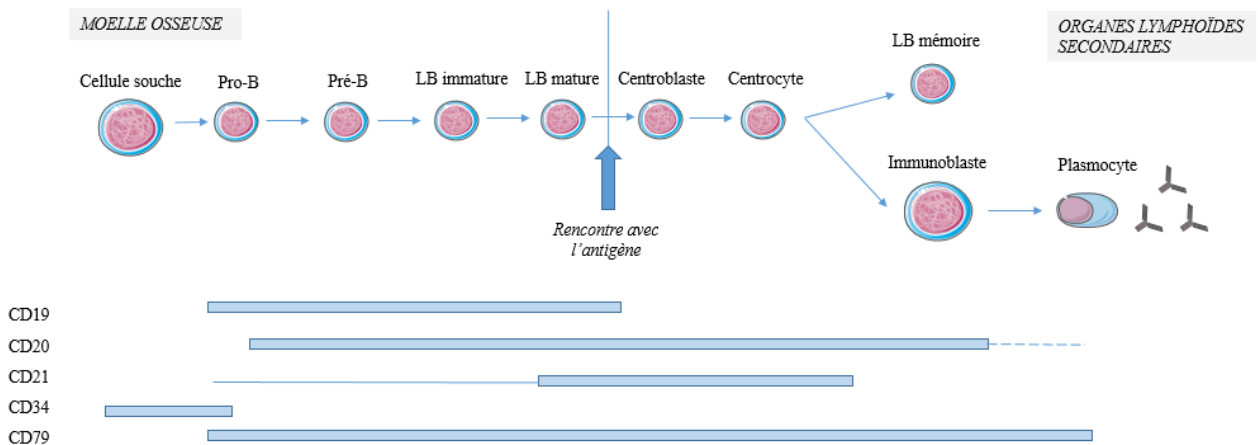


Figure 8 : Rappels sur la lymphopoïèse

La lymphopoïèse B est composée de plusieurs étapes de différenciation à partir d'une cellule souche hématopoïétique, sous l'action de chimiokines et cytokines, pour obtenir le lymphocyte B immature, qui pourra évoluer en lymphocyte B mature puis en plasmocyte après avoir migré dans les organes lymphoïdes secondaires. Au cours de leur différenciation, les cellules acquièrent et perdent des marqueurs CD qui leur sont spécifiques (Espinosa and Chillet, 2010; Schroeder Jr, Radbruch and Berek, 2013).

On retrouve le CD20 dans la plupart des néoplasies touchant les cellules B, et il a été rapporté de manière exceptionnelle dans des cas des lymphomes T comme le lymphome cutané épithéliotrope (Ewing, Pieper and Stern, 2019).

Il représente ainsi une cible intéressante dans le diagnostic et la caractérisation des pathologies touchant les lymphocytes B.

Au vu du faible nombre de publications portant spécifiquement sur le CD20 du chien ou du chat, une partie des informations seront extrapolées à partir de recherches réalisées sur des lignées cellulaires humaines ou murines.

1) Structure et topographie du CD20

Le CD20 présente 3 isoformes, de poids moléculaire égaux à 33, 35, et 37kDa. Il est constitué en majorité d'hélices alpha et possède 4 domaines transmembranaires, ainsi que des extrémités N-terminale et C-terminale intracytoplasmiques (Figure 9). Il possède également 2 boucles extracellulaires (Congy-Jolivet and Cartron, 2014).

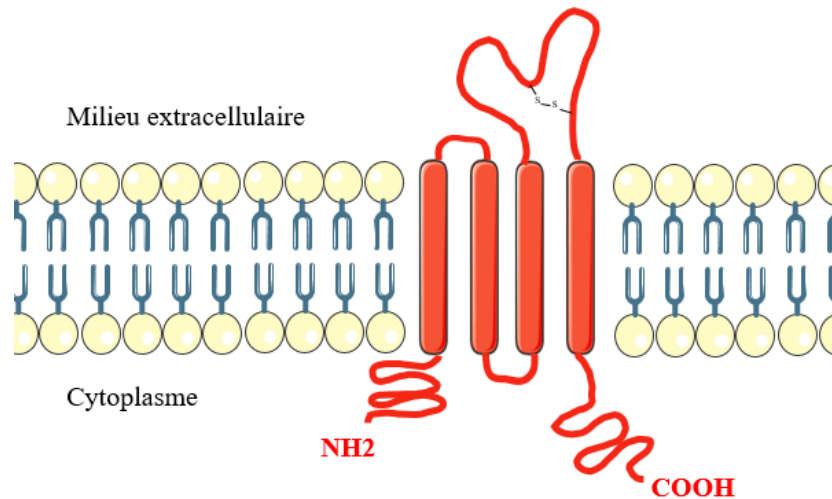


Figure 9 : Structure générale du CD20 au sein de la membrane

On estime qu'il existe entre 100 et 250 000 copies du CD20 par cellule sur la majorité des cellules B (Cragg *et al.*, 2005; Glennie *et al.*, 2007).

Au niveau de sa séquence primaire, le CD20 présente une homologie significative avec d'autres protéines transmembranaires faisant partie d'une famille génétique appelée MS4A (Liang and Tedder, 2001).

La structure secondaire du CD20 semble être très stable dans une large gamme de détergents et de températures (Ernst *et al.*, 2005).

a. Structure générale

▪ **Boucles extracellulaires :**

Les deux boucles extracellulaires du CD20 sont extrêmement différentes en termes de taille : la première peine à faire protrusion au-delà de la membrane cellulaire, comme dans de nombreuses protéines de la famille MS4A. Inversement, la deuxième boucle extracellulaire est de grande taille : elle contient approximativement 46 acides aminés, ainsi qu'un pont disulfure (Ernst *et al.*, 2005).

Le maintien de l'intégrité de ces boucles est essentiel à plusieurs mécanismes.

En effet, la liaison de nombreux anticorps (notamment le rituximab) au CD20 est dépendante de la conformation de la boucle entre la 3^{ème} et la 4^{ème} hélice transmembranaire, et notamment de la présence d'un pont disulfure formé entre ses résidus 167 et 183 (Binder *et al.*, 2006). La capacité à former ce pont est une caractéristique présente dans plus de 50% des protéines de la famille MS4A, et dépend de l'état d'oxydation des cystéines du domaine extracellulaire du CD20 (Ernst *et al.*, 2005).

▪ **Portion transmembranaire :**

Dans sa partie transmembranaire, le CD20 possède de nombreux résidus sérine et thréonine, qui sont des sites potentiels de phosphorylation (Congy-Jolivet and Cartron, 2014).

▪ **Portion intracellulaire :**

Les résidus cytoplasmiques situés en position 219 à 225 dans la zone C-terminale semblent être impliqués dans la formation de structures appelées radeaux lipidiques : en effet, il a été prouvé que la délétion de ces résidus réduit ce mécanisme (Polyak, Tailor and Deans, 1998; Ernst *et al.*, 2005).

b. Organisation membranaire

Le CD20 semble exister le plus fréquemment sous forme de dimères ou tétramères au sein de la cellule (Figure 10). On le retrouve également en association avec d'autres protéines membranaires mais peu sous forme monomérique (Bubien *et al.*, 1993; Congy-Jolivet and Cartron, 2014).

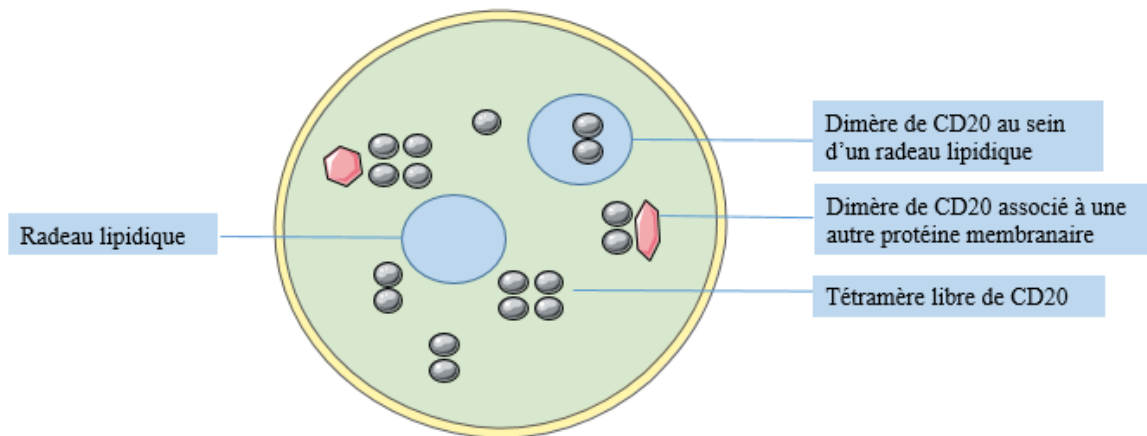


Figure 10 : Organisation membranaire du CD20. D'après (Congy-Jolivet and Cartron, 2014)

Chez l'humain, Li *et al.* ont identifié qu'approximativement 90% du CD20 membranaire est situé au niveau des microvilli membranaires, proche du BCR (*B-cell receptor*, impliqué dans la liaison des lymphocytes B aux antigènes) (Li *et al.*, 2004). Certaines études suggèrent ainsi que ces deux entités pourraient coopérer au niveau fonctionnel pour détecter et signaler les antigènes (Petrie and Deans, 2002).

2) Fonction biologique du CD20

La fonction exacte ainsi que le ligand physiologique du CD20 ne sont pas connus à l'heure actuelle. On suppose que le CD20 agit à la manière d'un canal ionique, ou active les canaux calciques, ce qui permettrait de réguler les premières étapes de l'activation des lymphocytes B (Cragg *et al.*, 2005; Jubala *et al.*, 2005).

a. CD20 et mouvements de calcium dans la cellule

Le CD20 possède en effet une structure compatible avec un canal calcique : c'est une phosphoprotéine composée de 4 domaines transmembranaires, avec des extrémités N-terminale et C-terminale intracytoplasmiques, sans activité enzymatique intrinsèque. Ainsi, il n'est pas surprenant que de nombreuses études suggèrent que le CD20 fonctionne de cette manière (Bubien *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2003; Cragg *et al.*, 2005).

Il a notamment été prouvé en 1993 par Bubien et son équipe que l'expression du CD20 à la surface des cellules était corrélée à l'augmentation de la conductance ionique au niveau de la membrane cellulaire, et plus particulièrement au passage d'ions Ca^{2+} dans le compartiment cytoplasmique. Les cellules CD20⁺ étudiées dans cette publication possédaient alors une activité cytosolique six fois plus élevée en Ca^{2+} libre que les cellules CD20⁻. L'hypothèse ainsi retenue par Bubien *et al.* est que le CD20 lui-même agit comme un canal ionique, augmentant la perméabilité membranaire au Ca^{2+} pendant au moins 24 heures lors de sa liaison par un anticorps monoclonal. De même, il a été prouvé dans cette étude que la concentration intracellulaire en Ca^{2+} au repos était proportionnelle au niveau d'expression du CD20 (Bubien *et al.*, 1993).

Par ailleurs, il a également été prouvé que le CD20 peut s'associer avec d'autres protéines de surface et cytosoliques (Tedder and Schlossman, 1988). Il demeure donc la possibilité que le CD20 soit impliqué dans un complexe multimoléculaire, et n'agisse pas individuellement comme un canal calcique. Par exemple, Uchida *et al.* ont mis en évidence dans une étude que le flux d'ions Ca^{2+} observé suite à la stimulation du BCR ou du CD19 était diminué dans les cellules où le CD20 avait été éliminé. Cette observation concorde avec l'hypothèse selon laquelle le CD20 ne serait pas uniquement lui-même un canal calcique, mais influencerait sur d'autres molécules qui le sont (Uchida *et al.*, 2004).

En parallèle, de par leur appartenance commune à la famille MS4A, le CD20 présente des similarités (de localisation chromosomique, de structure, et de séquence) avec un récepteur nommé FcεRI, présent notamment sur les mastocytes et les basophiles, qui permet la mobilisation de Ca^{2+} dans la cellule (Kepley, Wilson and Oliver, 1998). Il paraît alors possible que leur mode de fonctionnement soit en partie similaire, et que le CD20 possède un rôle indirect dans les mouvements de calcium au sein de la cellule.

Il existe également une hypothèse selon laquelle le CD20 agirait comme un SOC ou *store-operated channel*. Ces canaux s'ouvrent en réponse à une libération de Ca^{2+} par les compartiments intracellulaires (et notamment le réticulum endoplasmique). Ainsi, l'influx de calcium provenant du milieu extracellulaire contribue à la réplétion des stocks intracellulaires (Shan, Ledbetter and Press, 1998; Cragg *et al.*, 2005).

Toutes ces affirmations tendent à prouver que le CD20 lui-même agit comme un canal calcique, ou qu'il régule les mouvements de calcium via des voies d'activation d'autres molécules.

b. CD20 et régulation du cycle cellulaire

Le CD20 semble également jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire via les mouvements de calcium.

En effet, il a été prouvé en 1993 que la liaison d'un anticorps monoclonal anti-CD20 inhibait la progression des lymphocytes B vers le stade S du cycle cellulaire, ainsi que leur différenciation (Bubien *et al.*, 1993).

De plus, il est connu que la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire nécessite des variations du taux de calcium cytoplasmique, notamment via une libération du calcium présent dans les compartiments intracellulaires et via les flux provenant du milieu extracellulaire. Ainsi, le CD20, agissant directement comme canal calcique ou jouant un rôle sur les flux de calcium tel que nous l'avons vu précédemment, permettrait cette action sur la progression dans le cycle cellulaire en modulant la concentration calcique intracellulaire.

Enfin, le CD20 n'est pas phosphorylé dans les cellules B au repos, mais devient fortement phosphorylé lors de stimulation par des mitogènes, renforçant l'hypothèse de son lien avec l'activation et la différenciation des cellules B (Tedder and Schlossman, 1988; Bubien *et al.*, 1993).

c. CD20 et radeaux lipidiques

Suite à la liaison du CD20 par des anticorps monoclonaux, on observe la redistribution du CD20 au niveau de la membrane plasmique, et la formation de structures appelées radeaux lipidiques.

Les radeaux lipidiques sont des domaines membranaires riches en sphingolipides, cholestérol, et protéines de signalisation (telles que les Src kinases). Il est supposé que ces domaines fonctionnent comme plateformes pour la transduction de signaux, et sont connus pour être impliqués dans les processus d'adhésion cellulaire (Cragg *et al.*, 2005).

Il a également été prouvé expérimentalement que la destruction de l'intégrité des radeaux lipidiques par extraction de cholestérol provoque l'inhibition complète de l'entrée de calcium secondaire à la liaison de l'anticorps lié. Ainsi, il est supposé que les radeaux lipidiques pourraient jouer un rôle dans les mouvements de calcium liés au CD20 (Li *et al.*, 2003; Janas *et al.*, 2005).

3) Intérêt du CD20

Dans de nombreux domaines, le CD20 est utilisé comme cible à des visées diagnostiques, thérapeutiques, ou expérimentales.

a. Intérêt diagnostique

Le CD79a était précédemment utilisé en tant que marqueur des cellules B en médecine humaine et vétérinaire, mais il a été prouvé que le CD20 présente une sensibilité supérieure (et une spécificité équivalente) (Adams *et al.*, 2009). Ainsi, le CD20 est de plus en plus utilisé comme marqueur de référence dans l'étude des lymphocytes B et des pathologies associées (Jubala *et al.*, 2005).

Il s'agit d'une cible particulièrement intéressante en recherche fondamentale et appliquée, car son expression peut être identifiée à la fois dans des tissus frais et anciens, et qu'il est stable dans les membranes cellulaires : il n'est ni internalisé ni détruit lors d'une liaison à un anticorps (Jubala *et al.*, 2005; Glennie *et al.*, 2007). Il permet ainsi de mettre les lymphocytes B en évidence de manière simple. Il a d'abord été utilisé dans un premier temps chez l'Homme, pour lequel il marque correctement environ 90% des lymphomes B. Son utilisation s'est aujourd'hui élargie à la médecine vétérinaire.

b. Intérêt thérapeutique

Au-delà de l'aspect diagnostique, le CD20 est l'une des premières molécules utilisées comme cibles immunothérapeutiques spécifique des lymphocytes B en médecine humaine.

Pour cela, on utilise des anticorps monoclonaux spécifiques du CD20. On peut citer notamment parmi les anticorps monoclonaux anti-CD20 les plus connus : le rituximab (premier anticorps monoclonal anti-CD20 approuvé par la Food and Drug Administration aux Etats Unis), l'ofatumumab, le veltuzumab, l'ublituximab, le tositumomab, l'obinutuzumab, ou encore l'ocrelizumab. La majorité de ces anticorps sont de type IgG1, pouvant recruter des effecteurs cellulaires, et induire différents mécanismes menant à la mort cellulaire, en fonction du récepteur et du type cellulaire (Boross and Leusen, 2012):

- induction de l'apoptose / mort cellulaire programmée (PCD ou *programmed cell death*)
- cytotoxicité complément-dépendante (CDC)
- cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

A l'heure actuelle, le CD20 est utilisé avec succès comme cible dans le traitement des lymphomes B et des leucémies chez l'Homme, que ce soit par seule utilisation d'anticorps anti-CD20, ou en association avec une chimiothérapie (Jubala *et al.*, 2005; Hauptrock and Hess, 2008). De par son absence à la surface des plasmocytes chez l'Homme, l'utilisation d'anticorps anti-CD20 n'entraîne pas de diminution significative du taux d'immunoglobulines dans l'organisme, ce qui présente un intérêt certain dans cette utilisation à but thérapeutique (Congy-Jolivet and Cartron, 2014). Les anticorps monoclonaux comme le rituximab présentent également l'avantage de ne pas provoquer de toxicité à long terme (Glennie *et al.*, 2007).

Depuis quelques années, on observe également un intérêt pour ces anticorps dans le traitement de pathologies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le pemphigus, ou le lupus érythémateux disséminé (Kazkaz and Isenberg, 2004; Edwards and Cambridge, 2006; Wollina *et al.*, 2013).

c. Intérêt pronostique

Plusieurs études ont également prouvé que l'expression du CD20 présentait des implications en termes de pronostic et de réponse au traitement. Ces éléments n'ont à l'heure actuelle été testés qu'en médecine humaine.

Chez des patients humains, il a été prouvé que l'augmentation de l'expression du CD20 chez des patients atteints de lymphomes à grandes cellules permettait d'augmenter l'effet cytotoxique du rituximab (Shimizu *et al.*, 2010). Inversement, il a été établi par plusieurs études qu'une faible expression du CD20 était un facteur pronostique négatif chez les patients atteints de lymphome à grandes cellules et traités par chimiothérapie, avec une médiane de survie de 1.2 ans pour les patients présentant une faible expression du CD20, contre 3 ans pour les patients présentant une forte expression du CD20 (Johnson *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2016). Les lymphomes B à grandes cellules et les pathologies auto-immunes liées aux cellules B étant de plus en plus fréquents chez le chien, il est légitime de s'attendre à ce que des résultats similaires soient publiés en médecine vétérinaire dans les années à venir (Jubala *et al.*, 2005).

Des résultats similaires ont été obtenus lors d'une étude réalisée sur plusieurs types de lymphomes B humains, qui a permis de mettre en évidence un seuil d'expression du CD20 au-dessus duquel les patients présentaient une durée de vie plus longue et une meilleure réponse à la chimiothérapie que les patients présentant une valeur inférieure au seuil (Prevodnik *et al.*, 2011).

Il a également été prouvé que lors d'anomalies d'expression du CD20 (délétions, internalisation dans le cytoplasme, mutations...), le patient présente une plus faible sensibilité au traitement au rituximab (Mishima *et al.*, 2011; Small, McLeod and Richards, 2013; Tokunaga *et al.*, 2014).

Ainsi, le CD20 semble représenter un excellent marqueur des lymphocytes B, qu'ils soient normaux ou intégrés dans des processus inflammatoires ou néoplasiques. Dans ce cadre, il représente une cible intéressante dans le cadre de protocoles d'immunohistochimie tels que celui réalisé dans la partie expérimentale à venir. L'étude réalisée vise à caractériser le type d'expression du CD20 au sein des tissus lymphoïdes normaux, réactionnels, et pathologiques chez le chien et le chat, au moyen d'un anticorps polyclonal. Cette étude n'a pas de vocation d'exhaustivité concernant tous les types de lymphomes connus.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE DE
L'EXPRESSION
IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU CD20 AU
MOYEN D'UN ANTICORPS POLYCLONAL
DANS LE TISSU LYMPHOIDE NORMAL ET
PATHOLOGIQUE DU CHIEN ET DU CHAT

I – MATERIEL ET METHODES

1) Anticorps utilisé

Le choix de l'anticorps s'est porté sur un anticorps polyclonal (IgG) produit par l'entreprise ThermoFisher Scientific : l'anticorps PA5-16701. Il s'agit d'un anticorps produit chez le lapin par inoculation avec un peptide synthétique dérivé de l'extrémité C-terminale intracytoplasmique du CD20 humain, et purifié par chromatographie d'affinité. Il est commercialisé sous forme liquide, à une concentration de 0.2 mg/mL dans une solution de tampon phosphate salin contenant 1% d'albumine de sérum bovin. Sa réactivité a été testée par ThermoFisher Scientific sur des échantillons canins, félins, humains, et murins, et des publications rapportent également une réactivité sur d'autres espèces (bovin, cheval, primates et porc) (Nielsen *et al.*, 2012; Marconato, Gelain and Comazzi, 2013; Ota-Kuroki *et al.*, 2014)

2) Choix des échantillons

Afin de sélectionner les échantillons utilisés dans cette étude, l'ensemble des échantillons d'organes lymphoïdes stockés au laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse entre 2014 et 2018 ont été recensés.

Parmi ceux-ci, tous les échantillons présentant des défauts de conservation ont été écartés, tandis que tous ceux présentant une qualité suffisante ont été inclus dans l'étude. Ainsi, 36 échantillons d'organes lymphoïdes sains (n = 7), réactionnels (n = 8), ou lymphomateux (n = 21) de chien et de chat ont pu être sélectionnés, pour un total de 27 individus.

3) Protocole utilisé

L'entreprise commercialisant l'anticorps conseille des dilutions de 1:400 à 1:800 dans le cadre de protocoles d'immunohistochimie. Ainsi, différents tests préliminaires ont été réalisés avec des dilutions variées de l'anticorps (de 1:400 à 1:800) associées à un pH haut (pH = 9) ou bas (pH = 6.1), afin de déterminer les paramètres permettant d'obtenir les meilleurs résultats de marquage.

Ainsi, le protocole final a été basé sur une dilution à 1:400 de l'anticorps associé à un pH de 9 pour la réactivation de l'antigène. Il repose sur une technique d'immunohistochimie en deux étapes avec amplification par un polymère.

Le protocole utilisé dans le cadre de cette étude est le suivant :

- 1- Mise en place des échantillons dans l'automate PT Link pour déparaffinage et réactivation de l'antigène : cycle de 30 minutes à 96°C avec solution EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (50X)
- 2- Rinçage 5 minutes dans un bain de tampon 20X
- 3- Installation des lames et réactifs dans l'automate DaKo Autostainer Plus
- 4- Mise en route du cycle d'immunohistochimie (Tableau 5)

Tableau 5 : Protocole d'immunohistochimie utilisé dans l'étude

Étape	Réactif utilisé (volume)	Durée
Rinçage	Tampon 20X	N/A
Blocage de la peroxydase endogène	H202 DakoS (100µL)	5 minutes
Rinçage	Tampon 20X	N/A
Blocage des protéines endogènes	Sérum normal de chèvre dilué à 1:10 (100µL)	20 minutes
Soufflerie	/	N/A
Anticorps primaire	Anticorps anti-CD20 dilué à 1:400 (100µL)	50 minutes
Rinçage	Tampon 20X	N/A

Amplification	<i>Dako EnVision+ Dual Link System HRP</i> : Ig de chèvre anti-souris et anti-lapin conjuguées à un polymère marqué à la peroxydase de raifort HRP (100µL)	30 minutes
Rinçage	Tampon 20X	N/A
Révélation	Substrat chromogène <i>DAB+</i> : tétrahydrochlorure de 3,3'diaminobenzidine (100µL)	10 minutes
Rinçage	Tampon 20X	N/A

- 5- Fin du cycle et retrait des échantillons de l'automate
- 6- Rinçage
- 7- Contre-coloration à l'hématoxyline pendant 45 secondes
- 8- Rinçage
- 9- Réhydratation en concentration croissante d'alcool par bains successifs (de 95° jusqu'à alcool absolu)
- 10- Bain de toluène
- 11- Montage des lames

Pour chaque échantillon, 5 lames ont été réalisées, et celle présentant la meilleure qualité finale a été sélectionnée. De même, pour chaque échantillon analysé, un témoin négatif a été réalisé, en suivant le protocole précédent sans inclure d'anticorps anti-CD20 (anticorps primaire).

4) Etablissement de la grille de lecture

Une grille de lecture a par la suite été construite, afin de standardiser autant que possible l'enregistrement des résultats. Ainsi, pour chaque lame étudiée, les informations suivantes ont été recensées :

- a. Référence de l'échantillon
- b. Espèce
- c. Organe
- d. Classe de l'échantillon (normal, réactionnel, pathologique)

e. Pour chaque zone histologique d'intérêt dans l'organe :

- **type cellulaire marqué.** Pour les populations tumorales, une évaluation quantitative subjective du marquage a été réalisée (marquage de plus ou moins de la moitié de la population tumorale) étant donné l'impossibilité de faire une quantification précise de la population marquée à partir d'une coupe.
- **localisation du marquage** sur ces cellules : cytoplasmique ou membranaire.
- **intensité du marquage.** Au vu de la subjectivité de l'observation du marquage, une échelle simplifiée a été établie concernant l'intensité de celui-ci : marquage faible, moyen, ou fort.

Préalablement à l'enregistrement des résultats correspondant à un échantillon, le témoin négatif a été étudié afin de s'assurer de l'absence de réactions croisées.

Les évaluations ont été réalisées par deux observateurs, dont un possédant une expérience de longue date en anatomie pathologique et immunohistochimie (M. DELVERDIER, *Diplomate of European College of Veterinary Pathology*).

II – RESULTATS

Pour l'ensemble des lames étudiées, les témoins négatifs sont de bonne qualité, avec une absence de bruit de fond et de réactions croisées.

1) Tissu lymphoïde sain

a. Chien

i. Nœud lymphatique

Deux lames de nœuds lymphatiques de chiens sains ont été marquées. Pour chacune d'entre elles, on observe un marquage membranaire moyen des lymphocytes dans toutes les zones où ils sont retrouvés : follicules, bande sous-sinusale, tissu parafolliculaire, cordons, sinus, et en petite quantité dans le paracortex. Au vu de la localisation des cellules marquées, on peut conclure que ce marquage concerne les lymphocytes B (Figures 11, 12, 13).

L'une des deux lames présente également un marquage membranaire moyen de cellules centrofolliculaires au sein des follicules secondaires, sans pouvoir catégoriser plus précisément ces cellules (centrocytes, centroblastes, immunoblastes...). Le CD20 étant exprimé dès le début de la différenciation des lymphocytes B, il n'est pas étonnant d'obtenir ce résultat.

Enfin, on retrouve sur les deux lames quelques cellules présentant un reliquat d'expression membranaire faible compatible avec des plasmocytes, localisés au sein des cordons médullaires.

ii. Rate

Un seul échantillon de rate de chien sain est analysé. On y observe des lymphocytes avec un marquage membranaire fort en grande quantité au sein des follicules de la pulpe blanche (B-dépendants), en cohérence avec la localisation des lymphocytes B dans cet organe.

Quelques cellules compatibles avec des immunoblastes ou centroblastes présentent également un marquage membranaire fort au sein des follicules, ce qui est une fois de plus compatible avec les stades auxquels le CD20 est présent sur la lignée lymphoïde B. On observe également quelques rares lymphocytes présentant le même marquage dans le manchon périartériel (qui est majoritairement T-dépendant, ainsi cette proportion n'est pas surprenante).

Aucune cellule n'est marquée au sein de la pulpe rouge.

b. Chat

i. Rate

Trois lames permettent d'étudier l'expression immunohistochimique au sein de rates de chats sains. Ces lames présentent toutes la même topographie de marquage : on y observe des lymphocytes marqués au sein du manchon périartériel (en très faible quantité), des follicules, et de la zone marginale. De plus, comme chez le chien, on retrouve une nouvelle fois des cellules marquées au sein des follicules et de la zone marginale compatibles avec des immunoblastes ou centroblastes (Figures 14 et 15).

Contrairement au chien, pour ces trois lames, on observe des cellules marquées au sein des ellipsoïdes de la pulpe rouge : lymphocytes et plasmocytes.

Le type de marquage est globalement homogène entre les lames : elles présentent toutes un marquage membranaire, dont deux lames avec un marquage fort et une avec un marquage moyen.

ii. Thymus

Un seul échantillon thymus de chat sain est étudiée. Cet organe étant le siège de la multiplication et la maturation des lymphocytes T, on s'attend à n'y retrouver aucun marquage.

Aucune cellule n'est marquée dans le cortex. Cependant, une population cellulaire est marquée au sein de la jonction cortico-médullaire (du côté de la médulla). Ces cellules de grande taille

dont la structure est compatible avec des lymphocytes semblent présenter à la fois un marquage membranaire fort et un marquage cytoplasmique moyen (Figures 16 et 17).

On suspecte que ces cellules témoignent d'un processus d'élimination des lymphocytes B résiduels encore en cours au moment du prélèvement de l'échantillon. Une autre hypothèse serait qu'une certaine catégorie de lymphocytes T retrouvés dans cette zone présentent le CD20.

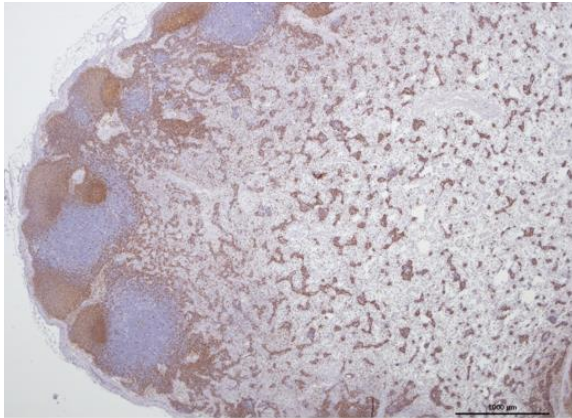


Figure 11 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x20) : marquage dans l'ensemble du parenchyme nodal.

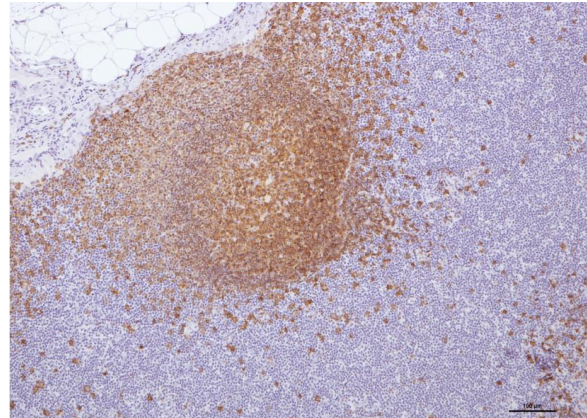


Figure 12 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x100) : marquage des lymphocytes B au sein d'un follicule.

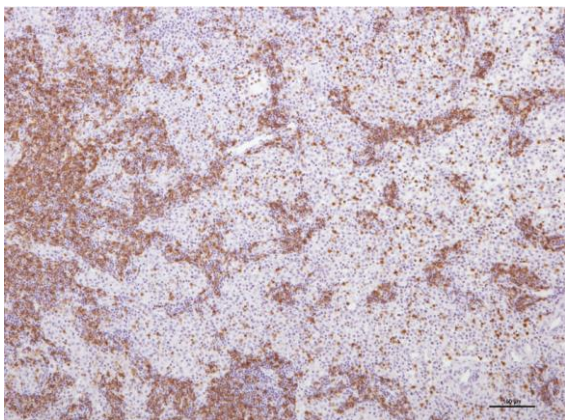


Figure 13 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x100) : marquage des lymphocytes B au sein du cortex profond et de la médulla.

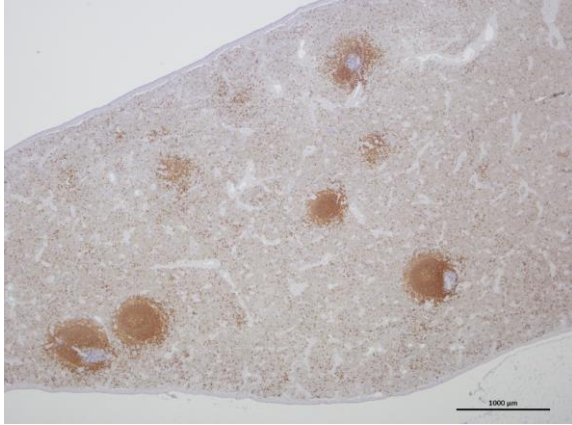


Figure 14 : Rate, chat (expression du CD20, x20) : marquage au sein de la pulpe blanche.

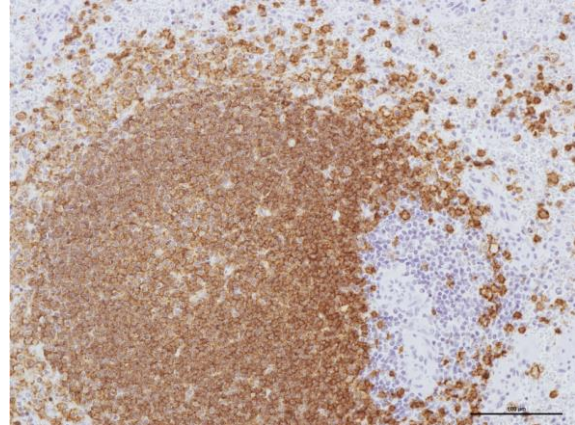


Figure 15 : Rate, chat (expression du CD20, x200) : marquage cellulaire au sein d'un follicule splénique.

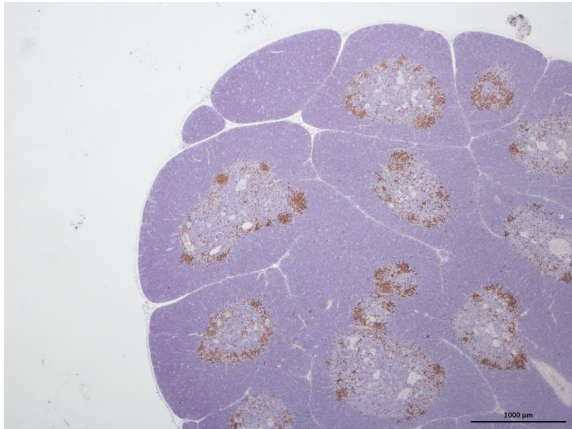


Figure 16 : Thymus, chat (expression du CD20, x20) : marquage au sein de la jonction cortico-médullaire.

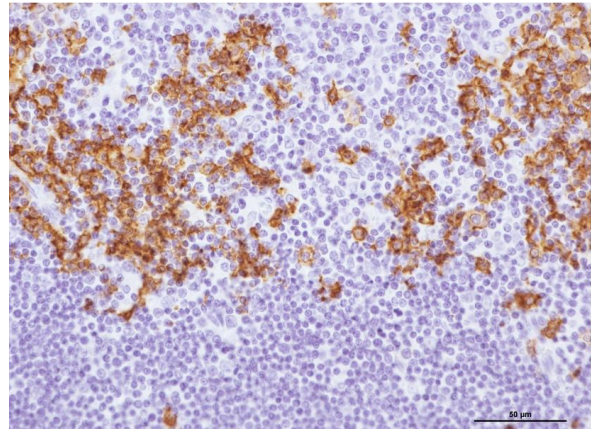


Figure 17 : Thymus, chat (expression du CD20, x400) : marquage de lymphocytes au sein de la jonction cortico-médullaire.

2) Tissu lymphoïde réactionnel

a. Chien

i. Nœud lymphatique

Un seul nœud lymphatique réactionnel de chien est étudié (Figure 18). Il s'agit d'un nœud lymphatique inguinal présentant une lymphadénopathie réactionnelle, associé à de nombreuses anomalies à l'examen nécropsique : œdème du poumon, mélanome cutané avec métastase ganglionnaire, léiomyome gastrique, hamartome vasculaire...

A l'observation de l'échantillon de nœud lymphatique, on remarque des lymphocytes avec un marquage membranaire fort au sein de l'ensemble du cortex superficiel (follicules, bande sous-sinusale, tissu parafolliculaire). Quelques lymphocytes présentent le même type de marquage au sein du paracortex.

Au sein des cordons de la médulla, comme chez le chien sain, on retrouve un petit nombre de cellules semblables à des plasmocytes présentant un marquage membranaire moyen.

Enfin, on retrouve des lymphocytes avec un marquage membranaire fort dans l'ensemble des sinus.

ii. Rate

Deux lames de rates réactionnelles de chiens ont ici été étudiées.

Individu 1 :

Sur le premier individu, on met en évidence des aires B hyperplasiées et une structure compatible avec une hyperplasie nodulaire du vieux chien. Les observations nécropsiques rapportent la présence d'une masse splénique de 15x13cm, hémorragique à la coupe, sans signe de dissémination métastatique. La zone observée lors de l'étude n'inclut pas cette masse de grande taille mais d'autres nodules d'hyperplasie splénique.

Individu 2 :

Pour le second individu, on observe une légère hyperplasie lymphoïde multifocale et des foyers d'hématopoïèse extramédullaire, compatibles avec le jeune âge de l'animal (1 mois) ou une rate réactionnelle.

Pour ces deux échantillons, on observe des cellules marquées similaires aux lames de rates d'animaux sains : quelques lymphocytes marqués au sein du manchon périartériel, des lymphocytes ainsi que des cellules compatibles avec des immunoblastes/centroblastes marqués au sein des follicules et de la zone marginale, et des lymphocytes et plasmocytes marqués au sein de la pulpe rouge.

Le marquage est membranaire pour les deux échantillons étudiés. Au sein de la lame compatible avec une hyperplasie nodulaire, le marquage est faible pour toutes les cellules marquées, tandis qu'il est moyen à fort suivant les zones chez le deuxième individu.

iii. Plaques de Peyer

Une seule lame permet d'observer le marquage de plaques de Peyer chez un chien, qui sont ici fortement réactionnelles. Des lymphocytes y présentent un marquage membranaire moyen dans l'ensemble des tissus lymphoïdes : en très grande majorité dans les follicules, et en faible quantité dans le tissu parafolliculaire et lymphoépithélium (Figures 19, 20, 21). Cette répartition est compatible avec celle des lymphocytes B.

On observe également quelques plasmocytes présentant le même type de marquage au sein des villosités intestinales.

b. Chat

i. Nœud lymphatique

Trois échantillons de nœuds lymphatiques réactionnels sont observés, présentant tous une hyperplasie lymphoïde marquée. Pour chacun d'entre eux, on observe un marquage de lymphocytes sur l'ensemble des tissus.

Individu 1 :

Pour le premier échantillon, on observe une hyperplasie lymphoïde marquée, essentiellement folliculaire, sans critère en faveur d'un processus tumoral ni élément pathogène. Par ailleurs, l'examen nécropsique révélait également une légère hépatite aiguë. L'hypothèse d'un phénomène systémique ou digestif répercuté sur le foie et les nœuds lymphatiques mésentériques semblait à privilégier.

Sur cet échantillon de nœud lymphatique mésentérique, le marquage des lymphocytes est membranaire et moyen à fort (cette variation est due à un effet bord observable sur la lame, probablement secondaire à un défaut lors de la réalisation du protocole).

Comme dans les nœuds lymphatiques sains, on observe au sein des cordons médullaires la présence de quelques cellules compatibles avec des plasmocytes présentant un marquage membranaire moyen.

Individu 2 :

Le deuxième échantillon est un nœud lymphatique iliaque présentant une hyperplasie lymphoïde diffuse marquée, plus accentuée sur les zones B-dépendantes, avec de nombreux follicules secondaires. Par ailleurs, d'autres prélèvements (non accessibles pour cette étude) avaient mis en évidence une entérite chronique lymphoplasmocytaire, une hépatopathie vacuolaire, et une légère splénite neutrophilique. Il était alors impossible d'exclure que les lésions jéjunales représentaient une amorce de transition vers un processus néoplasique. Aucun marquage immunohistochimique n'avait cependant été réalisé lors de l'étude initiale.

L'ensemble des lymphocytes marqués présentent un marquage membranaire faible à moyen suivant les zones (le marquage semble plus fort au sein de la bande sous-sinusale).

Individu 3 :

Sur cet échantillon de nœud lymphatique réactionnel, on observe des lymphocytes marqués suivant la même topographie que les autres échantillons. Il s'agit ici d'un marquage membranaire faible.

On y observe également une nouvelle fois un marquage membranaire moyen de quelques plasmocytes dans les cordons médullaires.

ii. Rate

Un seul échantillon de rate de chat est observé. On y observe une hyperplasie diffuse marquée de la pulpe blanche.

Comme chez le chien, on observe :

- Des lymphocytes marqués dans le manchon périartériel (en petite quantité), les follicules, la zone marginale, et les ellipsoïdes de la pulpe rouge.
- Des immunoblastes/centroblastes marqués au sein des follicules et de la zone marginale
- Des plasmocytes marqués dans les ellipsoïdes de la pulpe rouge

Toutes les cellules marquées y présentent un marquage membranaire faible à moyen.

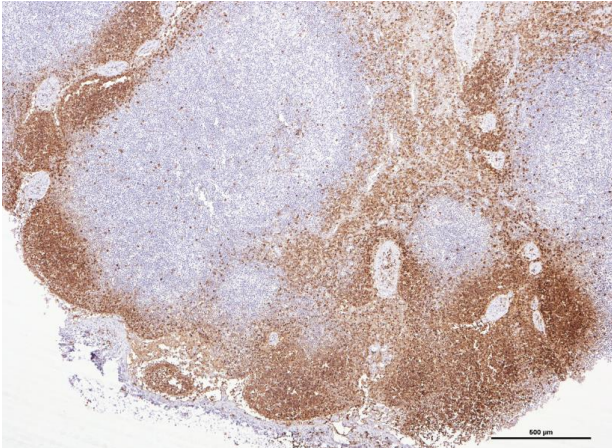


Figure 18 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x20) : marquage au sein du cortex et des sinus.

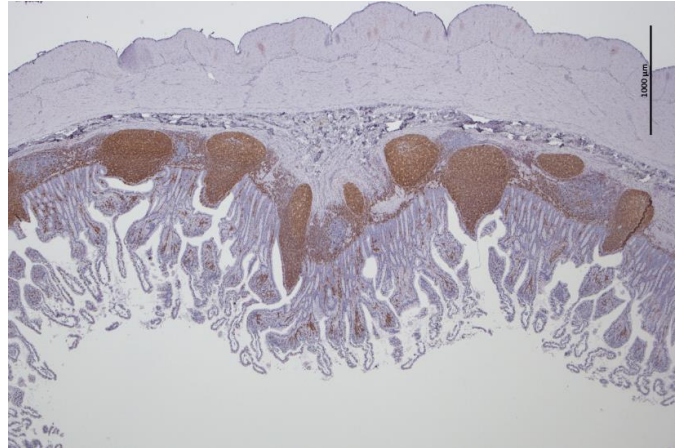


Figure 19 : Iléon, chien (expression du CD20, x20) : marquage au sein des plaques de Peyer.

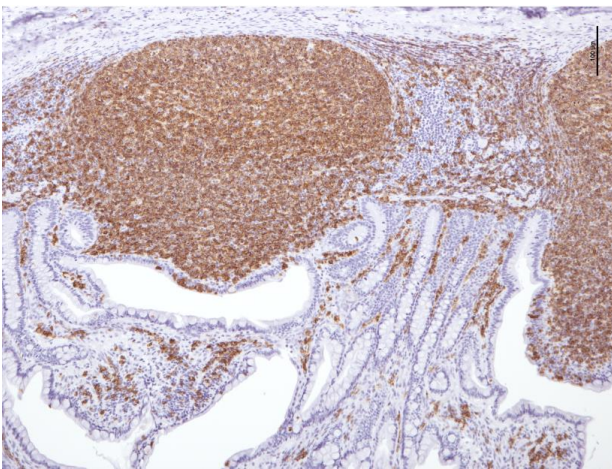


Figure 20 : Iléon, chien (expression du CD20, x100) : marquage des follicules et du tissu parafolliculaire.

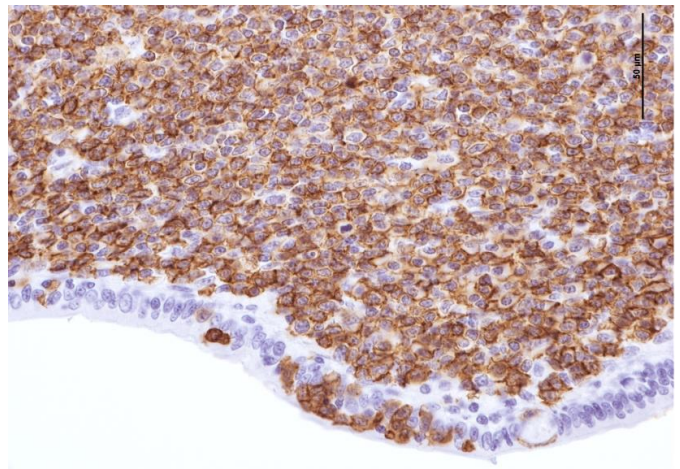


Figure 21 : Iléon, chien (expression du CD20, x400) : marquage de lymphocytes au sein d'un follicule et du lymphoépithélium

3) Tissu lymphoïde pathologique

Dans un souci de clarté, les résultats concernant les échantillons lymphomateux seront classés par espèce puis par types de lymphomes étudiés et non par organes.

a. Chien

i. Lymphome B de haut grade de malignité

Pour l'ensemble de ces échantillons, le diagnostic de lymphome B de haut grade de malignité a été confirmé par immunohistochimie via d'autres marqueurs dans des études préalables.

Individu 1 :

Pour cet individu, on dispose d'échantillons de nœud lymphatique, de rate, de foie et de rein.

Au sein du nœud lymphatique iliaque, on observe une infiltration diffuse par des cellules centroblastiques/centrocytiques. Deux types de cellules marquées sont observées :

- De grandes cellules tumorales, présentant un marquage cytoplasmique faible à moyen de plus de la moitié de la population
- Quelques petites cellules (probablement des lymphocytes matures) présentant un marquage membranaire moyen à fort

On retrouve ces deux mêmes types de cellules au sein de l'échantillon de rate de cet individu : de petites cellules matures (non tumorales) avec un marquage membranaire fort au sein du manchon périartériel de la pulpe blanche, et de grandes cellules tumorales présentant toutes un marquage cytoplasmique faible à modéré au sein des ellipsoïdes de la pulpe rouge. L'ensemble de cette prolifération lymphomateuse envahit le parenchyme splénique de manière diffuse. On y observe également des foyers d'hématopoïèse extramédullaire.

Concernant l'échantillon de foie, on observe une infiltration de l'espace porte par le même type de cellules lymphocytaires de grande taille, avec un marquage cytoplasmique faible de moins

de la moitié de cette population, témoignant d'un moins bon marquage sur cet échantillon comparativement aux autres organes étudiés sur cet animal.

Enfin, cet animal présente également une infiltration tumorale rénale, avec un envahissement lymphomateux plus marqué à la jonction cortico-médullaire. Comme pour les autres organes étudiés, on observe deux types de cellules marquées : de rares lymphocytes matures à marquage membranaire fort, et des cellules de grande taille avec un marquage cytoplasmique faible (sur moins de la moitié de la population). Ces cellules marquées sont présentes au sein du tissu interstitiel du cortex et de la médulla rénale.

Individu 2 :

Pour ce cas, on dispose uniquement d'un échantillon de nœud lymphatique. L'architecture nodale est conservée mais présente un infiltrat diffus, densément cellulaire, de grandes cellules avec un fort rapport nucléo-cytoplasmique. On observe également des atypies modérées (anisocaryose, irrégularité des contours nucléaires, indentations), et un index mitotique moyen. Un marquage immunohistochimique avait alors confirmé le diagnostic de lymphome B nodal de haut grade.

L'infiltrat est composé de cellules centroblastiques/centrocytaires, et la totalité de la population présente un marquage membranaire fort et un marquage cytoplasmique moyen (Figures 22 et 23).

Individu 3 :

On observe ici une biopsie cutanée, sur laquelle on retrouve une néoformation cutanée multicentrique densément cellulaire, d'aspect monomorphe. Elle est composée de nappes multifocales à coalescentes de grandes cellules rondes avec un rapport nucléocytoplasmique élevé à modéré. On remarque des atypies cytologiques marquées (anisocaryose, chromatine mottée, volume nucléolaire important, irrégularité des contours nucléaires, plurinucléation occasionnelle), et un index mitotique très élevé. Des plages de nécrose sont présentes. Cette présentation histologique est compatible avec une tumeur cutanée à cellules rondes, maligne et multicentrique. Le profil immunohistochimique réalisé préalablement à notre étude était revenu en faveur d'une prolifération lymphoïde maligne (lymphome B) de haut grade de malignité.

La population tumorale est composée de grandes cellules rondes présentes au sein de l'épiderme et du derme (superficiel et profond), dont la quasi-totalité présente un marquage membranaire fort (Figures 24 et 25).

On observe également au sein du derme le marquage membranaire fort de plasmocytes.

ii. Suspicion de lymphome de haut grade de malignité

Individu 4 :

On dispose pour cet individu d'un échantillon de nœud lymphatique.

L'architecture nodale n'est pas reconnaissable. En effet, elle est envahie par une prolifération de cellules rondes indépendantes agencées en nappes, de taille moyenne à grande, avec un fort rapport nucléo-cytoplasmique évoquant la lignée lymphoïde. On observe quelques atypies (anisocytose, anisocaryose, plurinucléolation), et un index mitotique variable. L'aspect histologique est en faveur d'un lymphome ganglionnaire de haut grade de malignité, mais aucun immunomarquage n'avait été réalisé lors de l'analyse initiale.

Cette population tumorale de grandes cellules centroblastiques polymorphes présente un marquage membranaire fort, et occasionnellement un marquage cytoplasmique faible.

iii. Suspicion de lymphome de grade inconnu

Individu 5 :

Pour le premier, seul un échantillon de nœud lymphatique est disponible. On y observe une infiltration par une population tumorale de cellules centroblastiques polymorphes, avec un marquage membranaire faible de l'ensemble de la population.

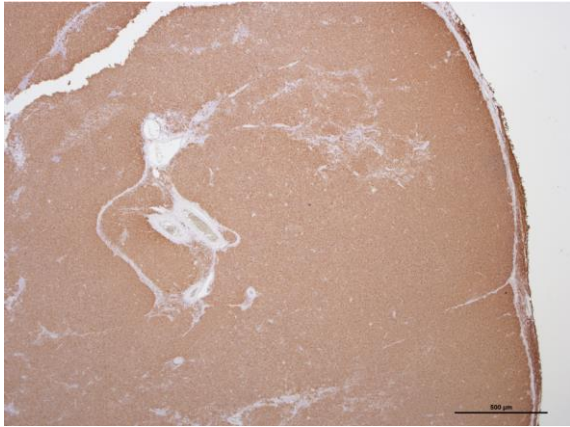


Figure 22 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x40) : marquage de la totalité du parenchyme nodal.

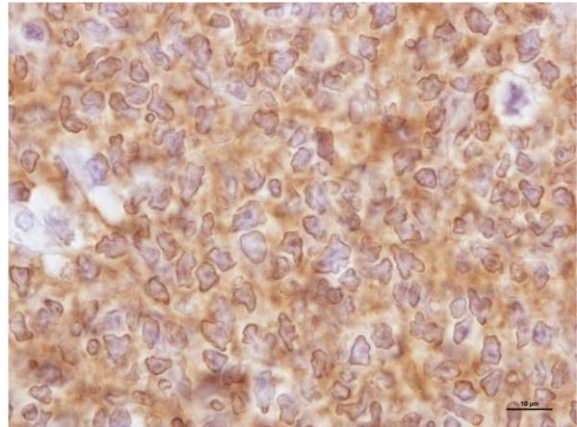


Figure 23 : Nœud lymphatique, chien (expression du CD20, x1000) : marquage membranaire et cytoplasmique de la population tumorale.

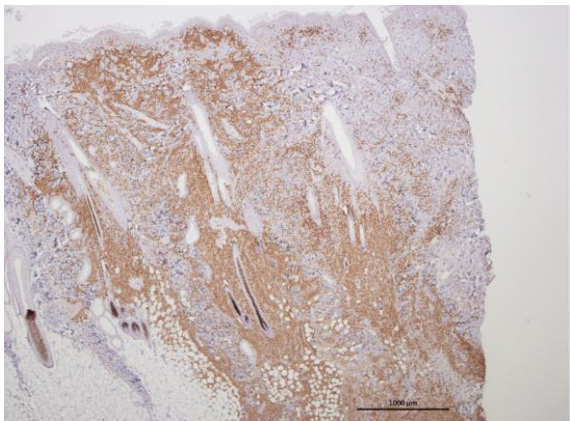


Figure 24 : Peau, chien (expression du CD20, x20) : marquage de cellules tumorales au sein de l'épiderme et du derme.

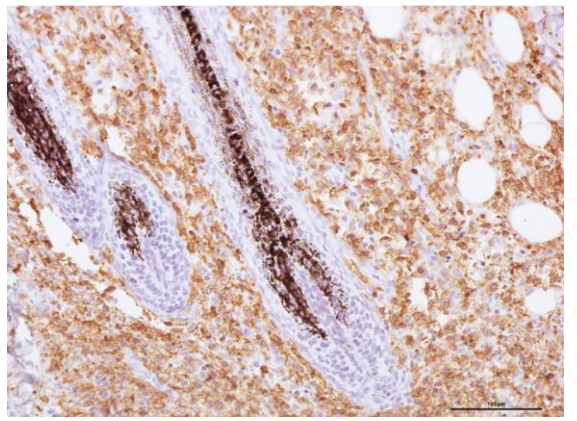


Figure 25 : Peau, chien (expression du CD20, x200) : marquage de cellules tumorales au sein du derme.

b. Chat

i. Lymphome B de haut grade de malignité

Pour l'ensemble de ces échantillons, le diagnostic de lymphome B de haut grade de malignité a été confirmé par immunohistochimie via d'autres marqueurs dans des études préalables.

Individu 1 :

Sur cet individu, 19 biopsies gastriques ont été réalisées dans l'ensemble des régions de l'estomac, révélant une prolifération lymphoïde atypique associée à une gastrite chronique diffuse lymphoplasmocytaire. Les précédents immunomarquages avaient confirmé l'hypothèse de l'émergence d'un lymphome B de haut grade de malignité dans ce contexte.

Sur l'échantillon gastrique étudié, on retrouve une infiltration marquée du chorion par une population à dominante lymphoplasmocytaire. Sur certaines plages, l'infiltration semble être uniquement lymphocytaire. L'ensemble de cette population présente un marquage membranaire fort.

Individu 2 :

Pour cet individu, on dispose d'une biopsie de fundus gastrique, sur laquelle on observe un infiltrat lymphocytaire multifocal dans toute l'épaisseur de la muqueuse. Une deuxième biopsie (indisponible dans le cadre de notre étude) avait également révélé la présence d'un contingent de grandes cellules d'allure blastique, avec un rapport nucléocytoplasmique modéré, des atypies assez nettes (anisocaryose, quelques irrégularités de contours nucléaires...) et de rares mitoses. Le précédent marquage immunohistochimique avait révélé un profil compatible avec un lymphome gastrique B de haut grade de malignité.

L'ensemble de l'infiltrat lymphocytaire (population tumorale) présent sur la biopsie étudiée présente un marquage membranaire fort.

ii. Suspicion de lymphome de haut grade de malignité

Individu 3 :

Pour ce chat, on observe au sein de la structure de l'estomac la présence d'une masse trans pariétale évoluant jusqu'au plan musculaire externe, compatible avec un lymphome gastrique de haut grade.

L'ensemble des cellules tumorales composant cette masse présente un marquage membranaire moyen à fort (Figure 26).

Individu 4 :

On dispose pour ce cas d'échantillons d'estomac, de duodénum, et rein prélevés chez un seul individu. Dans l'ensemble de ces organes, on observe une infiltration profonde par une population cellulaire tumorale (cellules moyennes à grandes).

Au sein des reins, on note une infiltration multicentrique, sous forme de nodules corticaux, par une prolifération de type lymphomateuse de cellules moyennes à grandes. Le même type de population est observé sur le tube digestif, avec une infiltration allant de la muqueuse à la musculuse pour l'estomac, et trans pariétale pour le duodénum. Cette présentation est compatible avec des métastases rénales secondaires à un lymphome pylorique. Aucun diagnostic de certitude par immunohistochimie n'avait été réalisé lors de l'analyse histologique initiale.

Dans l'estomac, l'ensemble de la population tumorale présente un marquage membranaire moyen. Le même marquage est retrouvé sur la totalité de la population tumorale dans le rein. Au sein du duodénum, on observe un marquage membranaire fort de plasmocytes.

Individu 5 :

Pour cet individu, on dispose d'un échantillon de nœud lymphatique intestinal. Son architecture est complètement effacée au profit d'une population tumorale. On y observe une prolifération tumorale de cellules rondes de taille moyenne à grande, regroupées sous forme de petits foyers,

qui présentent un marquage membranaire fort et un marquage cytoplasmique moyen. On retrouve également des plasmocytes présentant le même type de marquage.

Par ailleurs, un prélèvement de tube digestif présentant une masse avait été réalisé sur ce même individu. Les commentaires de l'analyse histologique rapportent une masse digestive constituée d'une prolifération cellulaire monomorphe effaçant les structures digestives, avec une infiltration trans pariétale. Ces cellules présentaient un fort rapport nucléocytoplasmique, une chromatine mottée, de nettes atypies cytologiques, et un index mitotique très élevé. Les observations rapportées concernant les deux échantillons (nœud lymphatique et intestin grêle) rapportent un aspect histologique de lymphome digestif trans pariétal de haut grade de malignité, avec dissémination au nœud lymphatique de drainage. Cet échantillon de tube digestif n'a pas pu être marqué dans le cadre de notre étude.

Individu 6 :

Il s'agit ici d'un échantillon de peau, dont l'aspect histologique est celui d'une tumeur maligne à cellules rondes, cutanée et sous-cutanée, multicentrique, de haut grade de malignité, dont les caractéristiques morphologiques et architecturales évoquent en première intention un lymphome.

On y observe une masse cutanée non encapsulée et aux contours mal définis, densément cellulaire, de croissance infiltrante, envahissant le derme et les muscles striés sous-jacents.

Elle est constituée d'une population tumorale en nappes confluentes (cellules rondes de grande taille à fort rapport nucléocytoplasmique) et de plages de nécrose, envahissant le derme et les tissus musculaires sous-jacents. On observe également des atypies cytologiques marquées (anisocytose, anisocaryose, irrégularité du contour nucléaire, plurinucléation...) et de nombreuses mitoses.

Moins de la moitié de la population tumorale présente un marquage membranaire faible à moyen. Cette présentation évoque une origine B mais le marquage semble peu conservé.

On observe également un marquage membranaire fort des plasmocytes au sein du derme.

iii. Lymphome B lymphoplasmocytaire

Individu 7 :

On observe ici un échantillon de nœud lymphatique de chat atteint de lymphome B lymphoplasmocytaire. Au sein du nœud lymphatique, on observe une population homogène et dense de petites cellules rondes (certaines d'entre elles présentant une différenciation plasmocytaire), dont plus de la moitié présente un marquage membranaire moyen.

iv. Lymphome B riche en cellules T

Individu 8 :

Pour cet individu, on dispose d'échantillons de nœud lymphatique et de peau.

Au sein du nœud lymphatique, on rencontre une population tumorale de grandes cellules majoritairement organisées en plages de forte densité compatibles avec d'anciens follicules remaniés (Figures 27 et 28). La quasi-totalité de cette population présente un marquage membranaire moyen à fort.

On observe également un certain nombre de petites cellules non marquées, compatible avec le contingent T de la population.

Individu 9 :

Chez cet individu, on observe uniquement une lame de masse trachéale. Cette masse infiltre l'ensemble de la muqueuse et de la sous-muqueuse, et semble composée de 2 populations : une population de cellules à petits noyaux denses, et une population de grandes cellules à gros noyaux, avec quelques cellules binucléées (noyaux « en miroir » fréquemment retrouvés dans les lymphomes B à cellules T).

La quasi-totalité de la population de grandes cellules présente un marquage membranaire et cytoplasmique faible.

v. Lymphome cutané T épithéliotrope

Individu 10 : T18/0136P

On observe pour cet individu une biopsie cutanée, présentant une infiltration multifocale du derme par des nappes de cellules d'allure tumorale évoquant la lignée lymphoïde : rondes, de taille petite à moyenne, à fort rapport nucléocytoplasmique. On note également de légères atypies (anisocaryose) et un faible index mitotique. Un immunomarquage réalisé dans une étude préliminaire avait confirmé le diagnostic de lymphome cutané T épithéliotrope, sans détermination du grade.

Au sein de cet échantillon de peau, aucun lymphocyte ne semble marqué, témoignant de l'absence de réactivité des lymphocytes T par rapport à l'anticorps utilisé. Seuls quelques plasmocytes rencontrés au sein du derme présentent un marquage membranaire moyen.

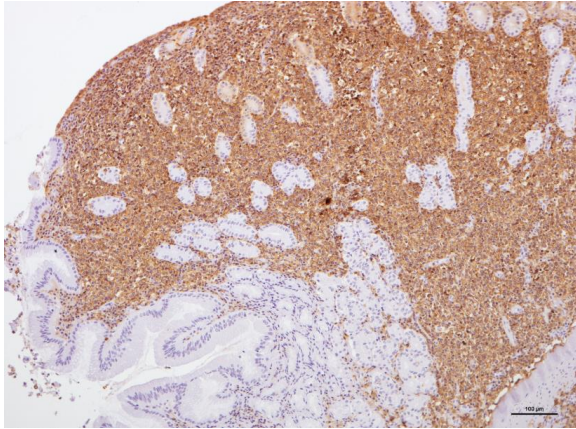


Figure 26 : Estomac, chat (expression du CD20, x100) : marquage de la totalité de la masse gastrique.

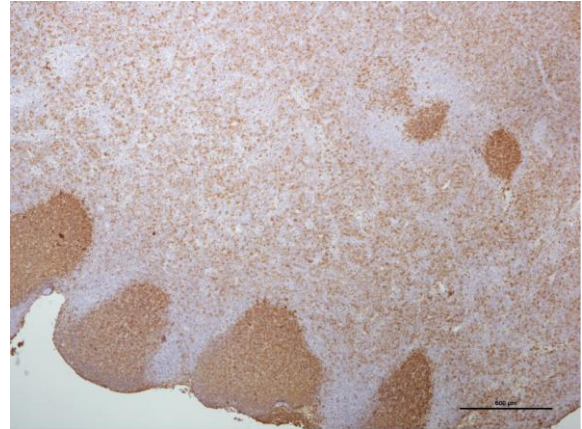


Figure 27 : Nœud lymphatique, chat (expression du CD20, x40) : marquage de follicules remaniés.

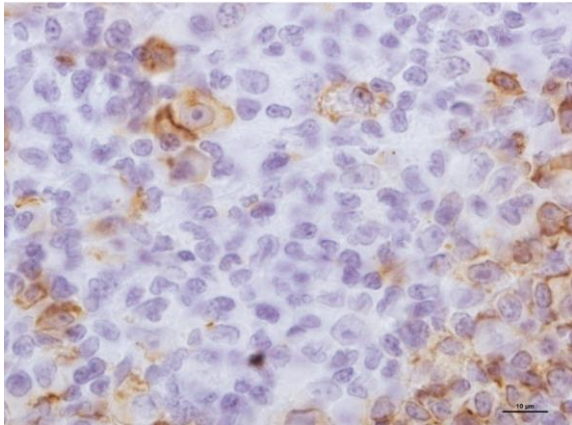


Figure 28 : Nœud lymphatique, chat (expression du CD20, x1000)

4) Synthèse des résultats

a. Populations cellulaires marquées

Comme présenté précédemment, un marquage a été observé sur l'ensemble des populations de lymphocytes (matures ou blastiques) correspondant au contingent B, dans tous les organes lymphoïdes normaux et réactionnels étudiés.

Un marquage est également observé sur la totalité des populations tumorales étudiées.

On observe globalement une absence de réactivité des lymphocytes T comme attendue (sauf dans un cas particulier : un thymus de chaton sain).

Il est intéressant de noter que des plasmocytes présentent également un marquage au sein de toutes les catégories d'échantillons.

b. Localisation du marquage

Le marquage observé est majoritairement membranaire dans l'ensemble des échantillons étudiés (58 marquages membranaires sur 68 observations de marquage au total, soit 85.3%).

On observe également quelques cas dans lesquels un marquage cytoplasmique est observé : 10 cas (14.7% des marquages), dont 6 où un marquage membranaire et un marquage cytoplasmique sont associés sur les mêmes cellules (8.8% des marquages).

Quatre échantillons présentent un marquage cytoplasmique uniquement ; ils appartiennent à un seul et même individu : un chien atteint de lymphome B de haut grade, chez qui l'ensemble de la population tumorale exprime uniquement un marquage cytoplasmique dans l'ensemble des échantillons d'organes étudiés (nœud lymphatique, rate, foie et rein).

Parmi les 6 cas de populations présentant un marquage multiple (cytoplasmique et membranaire), on retrouve :

- Des lymphocytes au sein d'un thymus de chaton sain

- Des cellules tumorales dans un nœud lymphatique de chien atteint de lymphome B de haut grade, un nœud lymphatique de chien avec une suspicion de lymphome de haut grade
- Des cellules tumorales et des plasmocytes au sein d'un nœud lymphatique de chat avec une suspicion de lymphome de haut grade
- Des cellules tumorales sur une masse trachéale de chat atteint de lymphome B riche en cellules T

c. Intensité du marquage

L'intensité du marquage obtenu est globalement excellente :

- Pour 50 marquages sur 68 (soit 73.5%), on observe une bonne qualité de marquage : intensité moyenne (n = 19, soit 27.9%), moyenne à forte (n = 8, soit 11.7%), ou forte (n = 23, soit 33.8%)
- 18 marquages de qualité inférieure : intensité faible à moyenne (n = 7, soit 10.3%) ou faible (n = 11, soit 16.2%)

III – DISCUSSION

1) Caractéristiques du marquage obtenu

Comme présenté dans la synthèse précédente, on constate dans cette étude que le CD20 se révèle être un excellent marqueur des lymphocytes B au sein des tissus lymphoïdes du chien et du chat, avec le plus généralement un marquage membranaire d'intensité moyenne à forte. De par sa qualité, ce marquage est aisément visualisable même au plus faible grossissement microscopique. On retrouve globalement la même qualité de marquage sur l'ensemble des échantillons normaux, réactionnels, et pathologiques observés.

Les résultats obtenus témoignent d'une très bonne validité du CD20 comme marqueur avec le protocole d'immunohistochimie utilisé, dans une grande variété de situations touchant aux organes lymphoïdes, allant jusqu'aux pathologies tumorales. En effet, tous les échantillons associés à un diagnostic (confirmé ou suspecté) de lymphome B ont révélé une bonne réactivité.

Par ailleurs, il semble intéressant de noter qu'un certain nombre de populations tumorales présentent un marquage cytoplasmique (seul ou associé au marquage membranaire). Ce type de marquage n'est pas retrouvé au sein des organes lymphoïdes réactionnels.

Enfin, le marquage présent chez l'individu présentant des lésions compatibles avec des métastases rénales secondaires à un lymphome pylorique nous laisse supposer que le CD20 serait un marqueur intéressant à la fois dans les processus néoplasiques primaires et métastatiques.

2) Marquage des plasmocytes

Dans la bibliographie étudiée pour ce travail, il semblait établi que les plasmocytes n'exprimaient pas le CD20. Cette affirmation semble être extrapolée depuis de nombreuses années à partir de l'espèce humaine, et aucun marquage de plasmocytes canins ou félins n'avait été rapporté.

Au sein de notre travail, nous avons cependant observé un marquage occasionnel de plasmocytes au sein de nœuds lymphatiques sains et réactionnels, de rate saine de chat, de plaques de Peyer réactionnelles de chien, et de rate réactionnelle de chat. Que ce soit sur des organes sains ou réactionnels, aucun plasmocyte marqué n'a été retrouvé dans des rates de chiens.

Ces plasmocytes marqués ont également été occasionnellement retrouvés en situation néoplasique :

- Dans 3 cas sur 4 de suspicion de lymphome félin de haut grade, sur des échantillons de duodénum, nœud lymphatique intestinal, et peau.
- Sur deux échantillons de peau : un chien atteint de lymphome B de haut grade, et un chat atteint de lymphome cutané T épithéliotrope

Les échantillons de peau analysés étant uniquement associés à un contexte de lymphome, il serait intéressant de réaliser le même marquage sur des échantillons sains afin de voir si ce marquage y est également retrouvé.

Chez l'Humain, de rares publications rapportent des cas isolés de plasmocytes CD20+ détectés par immunomarquage (Kremer *et al.*, 2005), mais toujours dans un contexte de plasmocytome. A l'inverse, nos observations semblent concerner toutes les catégories d'organes lymphoïdes, qu'ils soient normaux ou non.

Afin d'explorer ce marquage, nous pourrions envisager de réaliser un marquage du CD138 (spécifique des plasmocytes) sur les mêmes échantillons.

3) Intérêt de l'anticorps PA5-16701

A l'heure actuelle, une quarantaine de publications rapportent l'utilisation expérimentale de l'anticorps PA5-16701 anti-CD20, dont uniquement 14 concernant les espèces canine ou féline. Parmi celles-ci, il est utilisé dans divers objectifs :

- phénotyper des lymphomes afin de les caractériser précisément et souvent d'étudier par la suite différents marqueurs qui peuvent leur être associés
- établir un diagnostic de certitude de lymphome lors de présentations atypiques

- établir un diagnostic différentiel entre néoplasie et pathologies inflammatoires (sclérite nécrosante, encéphalite, pathologie histiocytaire inflammatoire...)
- marquer les lymphocytes pour suivre leur répartition au sein de différentes situations ou pathologies (transplantation de cellules stromales mésenchymateuses, oligodendrogliome, pathologies des cellules de Langerhans...)

On retrouve également une étude rapportant l'utilisation de l'anticorps PA5-16701 comme marqueur du CD20 pour créer et caractériser des lignées cellulaires tumorales à visée de recherche fondamentale. Ces publications rapportent souvent de faibles effectifs d'échantillons (voire des études de cas sur un seul individu).

Seule une publication (Asproni *et al.*, 2014) utilisant l'anticorps PA5-16701 concerne les mêmes catégories d'organes que ceux utilisés dans notre étude (organes lymphoïdes normaux, hyperplasiés et néoplasiques). Toutefois, ce marquage a uniquement été utilisé pour réaliser une différenciation entre phénotype B et T des lymphomes afin d'étudier la corrélation avec un autre marqueur (Cox-2), et les autres catégories d'organes n'ont pas subi le marquage.

Aucune des publications étudiées ne rapportent de caractérisation précise du type de marquage permis par l'utilisation de l'anticorps PA5-16701. Ainsi, notre étude présente un intérêt majeur dans la description de l'expression du CD20 au moyen de cet anticorps, sur une diversité de cas concernant les organes lymphoïdes canins et félins.

4) Comparaison avec d'autres marqueurs

a. CD79a

Pour 5 individus, nous disposons de résultats d'immunomarquage préalables à notre étude. Pour chacun de ces cas, un marquage fort du CD79a avait été observé. Tous ces cas présentent également un marquage par l'anticorps anti-CD20 : membranaire fort dans 4 cas sur 5, et cytoplasmique faible à moyen dans 2 cas. Ces résultats témoignent d'une bonne corrélation entre les marquages du CD20 et du CD79a.

Le CD79a est également un marqueur des lymphocytes B (présent du stade pré-B aux plasmocytes), utilisé en routine dans le marquage de ces cellules. Il est souvent utilisé en

corrélation avec le CD20, car ils présentent tous les deux des avantages dans la détection de certaines pathologies spécifiques.

Dans une étude de 2009, Adams *et al.* ont testé la sensibilité de différents marqueurs dans la détection d'un certain nombre de pathologies lymphoïdes chez l'Homme : le CD20 et le CD79a étaient alors les plus spécifiques (Sp = 100%), et le CD20 le plus sensible (Sp = 95%) pour le marquage de la lignée B dans les néoplasies lymphoïdes matures (Adams *et al.*, 2009). L'association de ces deux marqueurs permettrait alors d'obtenir la meilleure combinaison sensibilité/spécificité dans la détection des lymphomes B. Il serait intéressant d'envisager une étude similaire de comparaison CD79a/CD20 sur les pathologies lymphoïdes animales afin d'estimer la potentielle supériorité d'un marqueur sur l'autre.

Par ailleurs, le CD79a est généralement marqué par un anticorps monoclonal, ainsi l'utilisation de l'anticorps polyclonal anti-CD20 utilisé dans cette étude pourrait permettre de réduire les coûts si son utilisation seule se révélait suffisante ou supérieure pour les espèces animales.

b. BLA36

Chacun de ces 5 cas présentait également un fort marquage par le BLA36, qui est également un marqueur des lymphocytes B utilisé occasionnellement dans le marquage des lymphomes. Ainsi, il serait également intéressant de réaliser le même type d'étude comparative de ces deux marqueurs que mentionné précédemment.

c. CD3

Pour ces 5 échantillons, un précédent marquage du CD3 (marqueur spécifique des lymphocytes T) avait également été réalisé. Comme attendu, le cas de lymphome cutané T épithéliotrope présentant un fort marquage par le CD3 (marqueur des lymphocytes T) n'a montré aucune réactivité suite au marquage du CD20. Inversement, les cas de lymphomes B CD20+ étudiés présentent un marquage du CD3 absent ou faible.

5) Etude de la réactivité dans d'autres espèces

L'étude réalisée dans la partie expérimentale se concentrait exclusivement sur les espèces canines et félines. Ainsi, afin d'étudier brièvement la réactivité de l'anticorps dans d'autres espèces, un marquage sur des échantillons de cheval et de canard a été réalisé.

Seul un rapport de cas publié en 2016 rapporte l'utilisation du CD20 comme marqueur des lymphocytes chez le cheval dans un cas de suspicion de lymphome B (Vallone *et al.*, 2016). Cette publication relève un marquage CD20+ fort sur le tissu d'intérêt (cornée), mais ne précise aucun élément du protocole ou de l'anticorps de marquage utilisés. De même, sur l'ensemble des publications recensées par ThermoFisher Scientific utilisant l'anticorps PA5-16701, seules 3 études concernent l'espèce équine, et aucune ne l'utilise pour marquer des échantillons dans le cadre de lymphomes.

Dans le cadre de notre étude, un ensemble d'échantillons d'organes de cheval présentant un lymphome B à cellules T était disponible et a également été étudié. On dispose pour cet individu d'échantillons d'œil, membrane nictitante, conjonctive oculaire, et tissu intermandibulaire. Sur l'ensemble de ces échantillons, on observe un marquage membranaire moyen d'une partie de la population tumorale. De plus, sur la membrane nictitante, on observe de manière occasionnelle un marquage cytoplasmique faible de la population tumorale. Ainsi, le marquage obtenu confirme la réactivité de l'anticorps PA5-16701 sur le CD20 dans l'espèce équine

De la même manière, aucune publication accessible à l'heure actuelle ne rapporte une utilisation du CD20 comme marqueur des lymphocytes chez le canard. Ainsi, disposant d'un échantillon isolé de bourse de Fabricius chez un canard sain, nous l'avons soumis au même protocole de marquage que les autres échantillons. Une absence totale de marquage a alors été observé, alors qu'on pourrait s'attendre à un marquage de la population des lymphocytes B présents dans l'organe. Ce résultat témoigne de l'absence de réactivité de l'anticorps PA5-16701 anti-CD20 sur cette espèce.

6) Limites de l'étude et perspectives

Notre étude présente l'avantage de pouvoir évaluer l'expression du CD20 au moyen de l'anticorps PA5-16701 dans une diversité de situations.

Cependant, son aspect rétrospectif nous a imposé des limites en termes d'échantillons accessibles : il aurait par exemple été intéressant de tester le marquage sur tous les organes disponibles pour un animal donné, ce qui n'a pas été systématiquement possible ici. De la même manière, il aurait été intéressant d'étudier un plus grand nombre d'échantillons afin d'augmenter la significativité de nos résultats (en systématisant par exemple la présence de toutes les catégories – normal, réactionnel, pathologique – pour chaque organe étudié), et de pouvoir sélectionner de manière plus précise les types de pathologies intégrées dans l'étude. Il serait notamment intéressant de vérifier l'efficacité du marquage du CD20 dans des lymphomes de bas grade (les lymphomes étudiés ici étant tous diagnostiqués ou supposés comme étant de haut grade).

De plus, d'autres marquages par immunohistochimie (notamment CD3, CD79a, BLA36, et Ki67) avaient été réalisés sur certains individus mais pas sur tous, en accord avec les souhaits des propriétaires au moment du décès de l'animal. La systématisation de ces marquages aurait pu permettre une meilleure précision du diagnostic et de la caractérisation des lymphomes préalablement à notre étude.

Enfin, pour chaque individu, le compte rendu de l'examen anatomopathologique post-mortem a été récupéré. Cependant, cette étape préalable à notre étude n'ayant pas été réalisée systématiquement par le même opérateur, une variabilité dans le niveau de détail des observations a pu être observée.

Ainsi, en lien avec l'ensemble des résultats obtenus et les limites présentées ici, il serait intéressant d'élargir la gamme d'échantillons testés : en multipliant les individus pour chaque catégorie/organe, et en intégrant une plus grande diversité de types de lymphomes étudiés.

Conclusion

Ainsi, nous avons vu que dans un contexte clinique et biologique ambigu, l'immunohistochimie reste une technique de référence afin de réaliser le diagnostic différentiel entre un processus inflammatoire et néoplasique. De plus, le CD20, protéine transmembranaire présente sur les lymphocytes B, semble être un outil prometteur dans leur détection par immunohistochimie.

L'étude expérimentale réalisée ici visait à évaluer différents aspects de son expression au sein des tissus lymphoïdes normaux, réactionnels, et néoplasiques. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le CD20 se révèle être un excellent outil pour le marquage des lymphocytes B dans une grande variété de situations normales et pathologiques, au sein de l'ensemble des organes étudiés. En effet, il permet d'obtenir un marquage membranaire moyen à fort des lymphocytes dans la majorité des cas, y compris dans une diversité de cas de lymphomes.

Un marquage cytoplasmique des populations tumorales a également été relevé au sein de notre étude, ainsi qu'un marquage occasionnel de plasmocytes. Afin d'augmenter la significativité de ces observations, une étude similaire sur un plus grand nombre d'échantillons serait à envisager.

Références bibliographiques

- Adams, H. *et al.* (2009) 'Diagnostic utility of the B-cell lineage markers CD20, CD79a, PAX5, and CD19 in paraffin-embedded tissues from lymphoid neoplasms', *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 17, pp. 96–101.
- Al-Ghazlat, S., De Rezende, C. E. and Ferreri, J. (2013) 'Feline small cell lymphosarcoma versus inflammatory bowel disease: diagnostic challenges', *VetLearn Compendium*, 35(6), pp. E1–E6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677821>.
- Appelbaum, F. R. *et al.* (1984) 'Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy', *Hematological Oncology*, 2, pp. 151–168. doi: 10.1002/hon.2900020205.
- Asproni, P. *et al.* (2014) 'Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal, hyperplastic and neoplastic canine lymphoid tissues', *Journal of Comparative Pathology*. Elsevier Ltd, 151(1), pp. 35–41. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.03.008.
- Bauer, N. B., Zervos, D. and Moritz, A. (2007) 'Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n=101)', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, pp. 928–935.
- Bienzle, D. and Vernau, W. (2011) 'The Diagnostic Assessment of Canine Lymphoma: Implications for Treatment', *Clinics in Laboratory Medicine*, 31, pp. 21–39. doi: 10.1016/j.cll.2010.10.001.
- Binder, M. *et al.* (2006) 'The epitope recognized by rituximab', *Blood*, 108(6), pp. 1975–1978. doi: 10.1182/blood-2006-04-014639.
- Bloom, F. and Meyer, L. M. (1945) 'Malignant lymphoma (so-called leukemia) in dogs', *American Journal of Pathology*, 21(4), pp. 683–715.
- Boross, P. and Leusen, J. H. W. (2012) 'Mechanisms of action of CD20 antibodies.', *American Journal of Cancer Research*, 2(6), pp. 676–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3512181&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bratthauer, G. L. (1999) 'The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method and other all-immunologic detection methods', in Javois, L. C. (ed.) *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Second Edi. Humana Press, pp. 191–201.
- Breitschwerdt, E. B. *et al.* (1987) 'Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1(1), pp. 2–9.

- Briscoe, K. A. *et al.* (2011) 'Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma', *Journal of Comparative Pathology*. Elsevier Ltd, 145, pp. 187–198. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.12.011.
- Brown, W. (2001) 'Immunocytochemistry', in Ramzy, I. (ed.) *Clinical Cytopathology and Aspiration Biopsy: Fundamental Principles and Practice*, pp. 535–548.
- Bubien, J. K. *et al.* (1993) 'Transfection of the CD20 Cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes', *The Journal of Cell Biology*, 121(5), pp. 1121–1132.
- Burkhard, M. J. and Bienzle, D. (2013) 'Making Sense of Lymphoma Diagnostics in Small Animal Patients', *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43(6), pp. 1331–1347. doi: 10.1016/j.cll.2015.05.008.
- Burnett, R. C. *et al.* (2003) 'Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes', *Veterinary Pathology*, 40(1), pp. 32–41. doi: 10.1354/vp.40-1-32.
- Carrasco, V. *et al.* (2015) 'Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples', *Veterinary Pathology*, 52(4), pp. 668–675. doi: 10.1177/0300985814559398.
- Carreras, J. K. *et al.* (2003) 'Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997-2000)', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, pp. 326–331. doi: 10.1892/0891-6640(2003)017<0326:FEIMLC>2.3.CO;2.
- Carter, R. F., Valli, V. E. and Lumsden, J. H. (1986) 'The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation', *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50, pp. 154–164.
- Casamian-Sorrosal, D. *et al.* (2010) 'Comparison of histopathologic findings in biopsies from the duodenum and ileum of dogs with enteropathy', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, pp. 80–83. Available at: <http://weekly.cnbnews.com/news/article.html?no=124000>.
- Choi, C. H. *et al.* (2016) 'Prognostic Implication of Semi-quantitative Immunohistochemical Assessment of CD20 Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma', *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50, pp. 96–103. doi: 10.4132/jptm.2016.01.12.
- Congy-Jolivet, N. and Cartron, G. (2014) 'L'antigène CD20: structure, fonctions et ciblage', *Correspondances en Onco-Hématologie*, IX(3), pp. 104–108.
- Coons, A., Creech, H. J. and Jones, N. (1941) 'Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 47(2), pp. 200–

202.

Couraud, L. (2016) 'Le test de clonalité : le PARR', *PratiqueVet*, 51, pp. 698–700.

Cragg, M. S. *et al.* (2005) 'The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy', *Current Directions in Autoimmunity*, 8, pp. 140–174. doi: 10.1159/000082102.

Culmsee, K. *et al.* (2001) 'Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma', *Journal of Veterinary Medicine*, 47, pp. 199–206. doi: 10.1046/j.1439-0442.2001.00351.x.

Dabbs, D. (2002) 'Immunocytology', in Dabbs, D. (ed.) *Diagnostic immunohistochemistry*. 2nd edn, pp. 625–639.

Dobson, J. M. *et al.* (2001) 'Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma', *Journal of Small Animal Practice*, 42, pp. 377–384. doi: 10.1111/j.1748-5827.2001.tb02485.x.

Edwards, J. C. W. and Cambridge, G. (2006) 'B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases', *Nature Reviews Immunology*, 6, pp. 394–403. doi: 10.1038/nri1838.

Ernst, J. A. *et al.* (2005) 'Isolation and characterization of the B-cell marker CD20', *Biochemistry*, 44, pp. 15150–15158. doi: 10.1021/bi0511078.

Espinosa, E. and Chillet, P. (2010) *Immunologie*. Ellipses.

Evans, S. E. *et al.* (2006) 'Comparison of endoscopic and full-thickness biopsy specimens for diagnosis of inflammatory bowel disease and alimentary tract lymphoma in cats', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(9), pp. 1447–1450. doi: 10.2460/javma.229.9.1447.

Ewing, T. S., Pieper, J. B. and Stern, A. W. (2019) 'Prevalence of CD20 + cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma in dogs: a retrospective analysis of 24 cases (2011–2018) in the USA', *Veterinary Dermatology*, 30(1), pp. 51-e14. doi: 10.1111/vde.12703.

Fabrizio, F. *et al.* (2014) 'Feline mediastinal lymphoma : a retrospective study of signalment, retroviral status, response to chemotherapy and prognostic indicators', *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(8), pp. 637–644. doi: 10.1177/1098612X13516621.

Fetsch, P. A. and Abati, A. (2004) 'Ancillary techniques in cytopathology', in Atkinson, B. F. (ed.) *Atlas of Diagnostic Cytopathology*. 2nd edn, pp. 747–775.

Fisher, D. J. *et al.* (1995) 'Immunophenotyping lymphomas in dogs : a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples', *Veterinary Clinical Pathology*, 24(4), pp. 118–123.

Fournel-Fleury, C. *et al.* (1997) 'Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen', *Journal of Comparative Pathology*, 117, pp. 61–72. doi:

10.1016/S0021-9975(97)80066-7.

Fracácio, C. P. *et al.* (2018) 'Histopathological and immunophenotypical assessment of canine primary splenic lymphoma according to the World Health Organization', *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 38(11), pp. 2129–2132. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5328.

Fredriksson, S. *et al.* (2002) 'Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays', *Nature Biotechnology*, 20(5), pp. 473–477. doi: 10.1038/nbt0502-473.

Fukushima, K. *et al.* (2009) 'Sensitivity for the detection of a clonally rearranged antigen receptor gene in endoscopically obtained biopsy specimens from canine alimentary lymphoma', *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(12), pp. 1673–6. doi: 10.1292/jvms.001673.

Gabor, L. J., Canfield, P. J. and Malik, R. (1999) 'Immunophenotypic and histological characterisation of 109 cases of feline lymphosarcoma', *Australian Veterinary Journal*, 77(7), pp. 436–441. doi: 10.1111/j.1751-0813.1999.tb12085.x.

Gabor, L. J., Malik, R. and Canfield, P. J. (1998) 'Clinical and anatomical features of lymphosarcoma in 118 cats.', *Australian veterinary journal*, 76(11), pp. 725–732. doi: 10.1111/j.1751-0813.1998.tb12300.x.

Gall, E. A. and Mallory, T. B. (1942) 'Malignant lymphoma: a clinico-pathologic survey of 618 cases', *The American Journal of Pathology*, 18(3), pp. 381–429.

Gieger, T. (2011) 'Alimentary Lymphoma in Cats and Dogs', *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. Elsevier Ltd, 41, pp. 419–432. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.02.001.

Glennie, M. J. *et al.* (2007) 'Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies', *Molecular Immunology*, 44, pp. 3823–3837. doi: 10.1016/j.molimm.2007.06.151.

Gómez Román, V. R., Murray, J. C. and Weiner, L. M. (2013) 'Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)', in Ackerman, M. E. and Nimmerjahn, F. (eds) *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity*. 1st edn, pp. 1–27.

Greenlee, P. G. *et al.* (1990) 'Lymphomas in dogs a morphologic, immunologic, and clinical study', *Cancer*, 66(3), pp. 480–490. doi: 10.1002/1097-0142(19900801)66:3<480::AID-CNCR2820660314>3.0.CO;2-X.

Hauptrock, B. and Hess, G. (2008) 'Rituximab in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma', *Biologics: Targets and Therapy*, 2(4), pp. 619–633.

Jagielski, D. *et al.* (2002) 'A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998 – 2000)', *Journal of Veterinary Medicine*, 49, pp. 419–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450190>.

- Janas, E. *et al.* (2005) 'Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis', *Clinical and Experimental Immunology*, 139, pp. 439–446. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02720.x.
- Johnson, N. A. *et al.* (2008) 'Diffuse large B-cell lymphoma : reduced CD20 expression is associated with an inferior survival', *Blood*, 113(16), pp. 3773–3780. doi: 10.1182/blood-2008-09-177469.
- Jubala, C. M. *et al.* (2005) 'CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma', *Veterinary Pathology*, 42(4), pp. 468–476. doi: 10.1354/vp.42-4-468.
- Kazkaz, H. and Isenberg, D. (2004) 'Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases', *Current Opinion in Pharmacology*, 4, pp. 398–402. doi: 10.1016/j.coph.2004.03.006.
- Keller, E. T. *et al.* (1993) 'Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(5), pp. 289–295. doi: 10.1111/j.1939-1676.1993.tb01021.x.
- Kepley, C. L., Wilson, B. S. and Oliver, J. M. (1998) 'Identification of the FcεRI-activated tyrosine kinases Lyn, Syk, and Zap-70 in human basophils', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(2), pp. 304–315. doi: 10.1016/S0091-6749(98)70100-9.
- Kiupel, M. *et al.* (2011) 'Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples', *Veterinary Pathology*, 48, pp. 212–222. doi: 10.1177/0300985810389479.
- Kiupel, M., Teske, E. and Bostock, D. (1999) 'Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma', *Veterinary Pathology*, 36, pp. 292–300. doi: 10.1354/vp.36-4-292.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1976) 'Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion', *European Journal of Immunology*, 6, pp. 511–519. doi: 10.1002/eji.1830060713.
- Kremer, M. *et al.* (2005) 'Primary extramedullary plasmacytoma and multiple myeloma: phenotype differences revealed by immunohistochemical analysis', *Journal of Pathology*, 205(1), pp. 92–101. doi: 10.1002/path.1680.
- Ku, C. K., Kass, P. H. and Christopher, M. M. (2017) 'Cytologic–histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases', *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), pp. 1206–1217. doi: 10.1111/vco.12256.
- Leenaars, M. and Hendriksen, C. F. M. (2005) 'Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations', *ILAR Journal*, 46(3), pp. 269–279. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953834>.
- Li, H. *et al.* (2003) 'Store-operated Cation Entry Mediated by CD20 in Membrane Rafts', *The Journal*

of *Biological Chemistry*, 278(43), pp. 42427–42434. doi: 10.1074/jbc.M308802200.

Li, H. *et al.* (2004) ‘The CD20 calcium channel is localized to microvilli and constitutively associated with membrane rafts: Antibody binding increases the affinity of the association through an epitope-dependent cross-linking-independent mechanism’, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), pp. 19893–19901. doi: 10.1074/jbc.M400525200.

Liang, Y. and Tedder, T. F. (2001) ‘Identification of a CD20-, Fc ϵ RI β -, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse’, *Genomics*, 72, pp. 119–127. doi: 10.1006/geno.2000.6472.

Lipman, N. S. *et al.* (2005) ‘Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources’, *ILAR Journal*, 46(3), pp. 258–268. doi: 10.1093/ilar.46.3.258.

Lukes, R. J. and Collins, R. D. (1974) ‘Immunologic characterization of human malignant lymphomas’, *Cancer*, 34(4 Suppl), pp. 1488–1503.

Marconato, L., Gelain, M. E. and Comazzi, S. (2013) ‘The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review’, *Hematological Oncology*, 31(1), pp. 1–9. doi: 10.1002/hon.2017.

Mishima, Y. *et al.* (2011) ‘The identification of irreversible rituximab-resistant lymphoma caused by CD20 gene mutations’, *Blood Cancer Journal*. Nature Publishing Group, 1, p. e15. doi: 10.1038/bcj.2011.11.

Moore, A. (2013) ‘Extranodal lymphoma in the cat: prognostic factors and treatment options’, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, pp. 379–390. doi: 10.1177/1098612X13483236.

Moore, A. S. *et al.* (2012) ‘Histologic and Immunohistochemical Review of Splenic Fibrohistiocytic Nodules in Dogs’, *Journal of Veterinary Internal Medicine*.

Moore, F. M. *et al.* (1986) ‘Distinctive peripheral lymph node hyperplasia of young cats’, *Veterinary Pathology*, 23, pp. 386–391.

Moore, P. F. *et al.* (2005) ‘Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma’, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106, pp. 167–178. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.02.014.

Moore, P. F., Rodriguez-Bertos, A. and Kass, P. H. (2012) ‘Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype, and molecular clonality’, *Veterinary Pathology*, 49(4), pp. 658–668. doi: 10.1177/0300985811404712.

National Cancer Institute (1982) ‘National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin’s lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project.’, *Cancer*, 49(10), pp. 2112–35.

- Nielsen, J. S. *et al.* (2012) 'CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27 - memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer', *Clinical Cancer Research*, 18(12), pp. 3281–3292. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0234.
- O'Brien, D. *et al.* (2013) 'Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(4), pp. 949–954.
- Ota-Kuroki, J. *et al.* (2014) 'Intraocular and periocular lymphoma in dogs and cats: A retrospective review of 21 cases (2001-2012)', *Veterinary Ophthalmology*, 17(6), pp. 389–396. doi: 10.1111/vop.12106.
- Papakonstantinou, S. *et al.* (2013) 'Rapid, effective and user-friendly immunophenotyping of canine lymphoma using a personal flow cytometer', *Irish Veterinary Journal*, 66(1). doi: 10.1186/2046-0481-66-6.
- Parker, N. *et al.* (2016) '20.1 Polyclonal and Monoclonal Antibody Production', in *Microbiology*. OpenStax.
- Parodi, A. L. (2001) 'Classification of Malignant Lymphoma in Domestic Animals: History and Conceptual Evolution', *European Journal of Veterinary Pathology*, 7(2), pp. 43–50.
- Patterson-Kane, J. C., Kugler, B. P. and Francis, K. (2004) 'The possible prognostic significance of immunophenotype in feline alimentary lymphoma: A pilot study', *Journal of Comparative Pathology*, 130, pp. 220–222. doi: 10.1016/j.jcpa.2003.09.008.
- Paulin, M. V. *et al.* (2018) 'Feline low-grade alimentary lymphoma : an emerging entity and a potential animal model for human disease', *BMC Veterinary Research*. BMC Veterinary Research, 14(1), pp. 1–19.
- Penninck, D. *et al.* (2003) 'Diagnostic value of ultrasonography in differentiating enteritis from intestinal neoplasia in dogs', *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 44(5), pp. 570–575.
- Petrie, R. J. and Deans, J. P. (2002) 'Colocalization of the B Cell Receptor and CD20 Followed by Activation-Dependent Dissociation in Distinct Lipid Rafts', *The Journal of Immunology*, 169(6), pp. 2886–2891. doi: 10.4049/jimmunol.169.6.2886.
- Poggi, A. *et al.* (2017) 'Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma', *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(2), pp. 431–440. doi: 10.1111/vco.12184.
- Polyak, M. J., Taylor, S. H. and Deans, J. P. (1998) 'Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment', *The Journal of immunology*, 161, pp. 3242–3248. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.7028.

- Ponce, F. *et al.* (2004) 'Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy', *Veterinary Journal*, 167(2), pp. 158–166. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.10.009.
- Ponce, F. *et al.* (2010) 'A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology', *Veterinary Pathology*, 47(3), pp. 414–433. doi: 10.1177/0300985810363902.
- Prevodnik, V. K. *et al.* (2011) 'The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas', *Diagnostic Pathology*, 6(33). doi: 10.1186/1746-1596-6-33.
- Ragains, L. *et al.* (2003) 'Inflammatory bowel disease mimicking alimentary lymphosarcoma in a cat', *Veterinary Research Communications*, 27(SUPPL. 1), pp. 791–793. doi: 10.1023/B:VERC.0000014273.80853.c1.
- Ramos-Vara, J. (2005) 'Technical Aspects of Immunohistochemistry', *Veterinary Pathology*, (42), pp. 405–426.
- Ramos-Vara, J. A., Avery, P. R. and Avery, A. (2016) 'Advanced Diagnostic Techniques', in Raskin, R. E. and Meyer, D. J. (eds) *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*. 3rd edn, pp. 452–494.
- Ramos-Vara, J. A. and Borst, L. B. (2016) 'Immunohistochemistry: fundamentals and applications in oncology', in Meuten, D. J. (ed.) *Tumors in Domestic Animals*. 5th edn, pp. 44–87.
- Ramos-Vara, J. A. and Miller, M. A. (2006) 'Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+™ and ImmPRESS™', *Journal of Microscopy*, 224(2), pp. 135–139. doi: 10.1111/j.1365-2818.2006.01679.x.
- Rappaport, H. (1966) 'Discussion on: the pathology and nomenclature of Hodgkin's disease', *Cancer Research*, 26(6), pp. 1082–1083.
- Raskin, R. E. (2016a) 'General Categories of Cytologic Interpretation', in Raskin, R. E. and Meyer, D. J. (eds) *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*. 3rd edn, pp. 16–33.
- Raskin, R. E. (2016b) 'Hemolymphatic System', in Raskin, R. E. and Meyer, D. J. (eds) *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*. 3rd edn, pp. 91–137.
- Raskin, R. E. and Meyer, D. J. (2016) 'The acquisition and management of cytology specimens', in *Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide*. 3rd edn, pp. 1–15.
- Reid, V. *et al.* (2007) 'The first quantitative comparison of immunohistochemical rabbit and mouse monoclonal antibody affinities using biacore analysis', *Journal of Histotechnology*, 30(4), pp. 177–182. doi: 10.1179/his.2007.30.3.177.

Richter, K. P. (2003) 'Feline gastrointestinal lymphoma', *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(5), pp. 1083–1098.

Rudorf, H. *et al.* (2005) 'Ultrasonographic evaluation of the thickness of the small intestinal wall in dogs with inflammatory bowel disease', *Journal of Small Animal Practice*, 46, pp. 322–326.

Ruslander, D. A. *et al.* (no date) 'Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders', *In vivo (Athens, Greece)*, 11(2), pp. 169–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179611> (Accessed: 4 December 2017).

Sabattini, S. *et al.* (2016) 'Differentiating feline inflammatory bowel disease from alimentary lymphoma in duodenal endoscopic biopsies', *The Journal of small animal practice*, 57(8), pp. 396–401. doi: 10.1111/jsap.12494.

Sabattini, S. *et al.* (2018) 'Canine splenic nodular lymphoid lesions : immunophenotyping, proliferative activity, and clonality assessment', *Veterinary Pathology*, 55(5), pp. 645–653. doi: 10.1177/0300985818777035.

Sapierzyński, R. *et al.* (2016) 'Cytodiagnostics of canine lymphomas - Possibilities and limitations', *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(2), pp. 433–439. doi: 10.1515/pjvs-2016-0055.

Sato, H. *et al.* (2014) 'Prognostic analyses on anatomical and morphological classification of feline lymphoma', *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(6), pp. 807–811. doi: 10.1292/jvms.13-0260.

Schroeder Jr, H. W., Radbruch, A. and Berek, C. (2013) 'B-cell development and differentiation', in Rich, R. R. (ed.) *Clinical immunology: principles and practice*. 4th edn, pp. 90–101.

Scott, K. D. *et al.* (2011) 'Utility of endoscopic biopsies of the duodenum and ileum for diagnosis of inflammatory bowel disease and small cell lymphoma in cats', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, pp. 1253–1257.

Seelig, D. M. *et al.* (2016) 'The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma', *Veterinary Sciences*, 3(2), p. 11. doi: 10.3390/vetsci3020011.

Shan, D., Ledbetter, J. A. and Press, O. W. (1998) 'Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies.', *Blood*, 91(5), pp. 1644–52. doi: 10.1073/pnas.85.1.208.

Shimizu, R. *et al.* (2010) 'HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 24, pp. 1760–1768. doi: 10.1038/leu.2010.157.

Small, G. W., McLeod, H. L. and Richards, K. L. (2013) 'Analysis of innate and acquired resistance to anti-CD20 antibodies in malignant and nonmalignant B cells', *PeerJ*, 1, p. e31. doi: 10.7717/peerj.31.

- Sokołowska, J. *et al.* (2012) 'Proliferation activity in canine lymphomas', *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(4), pp. 727–734. doi: 10.2478/v10181-012-0111-6.
- Sözmen, M. *et al.* (2005) 'Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, pp. 323–330. doi: 10.1177/104063870501700404.
- Stefanello, D. *et al.* (2011) 'Splenic marginal zone lymphoma in 5 dogs (2001-2008)', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), pp. 90–93. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0639.x.
- Sternberger, L. A. *et al.* (1970) 'The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 18(5), pp. 315–333.
- Tedder, T. F. and Schlossman, S. F. (1988) 'Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 263(20), pp. 10009–10015.
- Teske, E. *et al.* (1994) 'Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(12), pp. 1722–1728.
- Teske, E. and Wisman, P. (1994) 'Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology.', *Experimental ...*, 22(May), pp. 1179–1187. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/7925781>.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) 'A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma', *Blood*, 89(11), pp. 3909–3918. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/89/11/3909.abstract>.
- Tokunaga, T. *et al.* (2014) 'De novo diffuse large B-cell lymphoma with a CD20 immunohistochemistry-positive and flow cytometry-negative phenotype: Molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity', *Cancer Science*, 105(1), pp. 35–43. doi: 10.1111/cas.12307.
- Tvedten, H. (2012) 'Cytology of inflammatory or neoplastic masses', in Willard, M. D. and Tvedten, H. (eds) *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 5th edn, pp. 337–363.
- Twomey, L. N. and Alleman, A. R. (2005) 'Cytodiagnosis of feline lymphoma', *VetCompendium*, (1), pp. 17–32.
- Uchida, J. *et al.* (2004) 'Mouse CD20 expression and function', *International Immunology*, 16(1), pp. 119–129. doi: 10.1093/intimm/dxh009.
- Vail, D. M. *et al.* (1998) 'Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats.', *Journal of Veterinary Internal*

Medicine, 12, pp. 349–354. doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02134.x.

Vail, D. M. (2011) ‘Tumors of the haemopoietic system’, in Dobson, J. M. and Lascelles, B. D. X. (eds) *BSAVA Manual of canine and feline oncology*, pp. 285–303.

Vail, D. M. and Young, K. M. (2007) ‘Hematopoietic tumors’, in Withrow, S. J. and Vail, D. M. (eds) *Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn, pp. 699–784.

Valli, V. E. *et al.* (2000) ‘The histologic classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the National Cancer Institute working formulation’, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, pp. 295–306. doi: 10.1177/104063870001200401.

Valli, V. E. (2007) ‘Normal and benign reactive hematopoietic tissues’, in *Veterinary Comparative Hematopathology*, pp. 9–117.

Valli, V. E. *et al.* (2011) ‘Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria’, *Veterinary Pathology*, 48, pp. 198–211. doi: 10.1177/0300985810379428.

Valli, V. E. *et al.* (2016) ‘Tumors of the hemolymphatic system’, in Meuten, D. J. (ed.) *Tumors in Domestic Animals*. 5th edn, pp. 203–321.

Vallone, L. V. *et al.* (2016) ‘Suspected malignant transformation of B lymphocytes in the equine cornea from immune-mediated keratitis’, *Veterinary Ophthalmology*, 19(2), pp. 172–179. doi: 10.1111/vop.12275.

Vezzali, E. *et al.* (2010) ‘Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO’, *Veterinary and Comparative Oncology*, 8, pp. 38–49. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x.

Vilches, G. and Ramos, A. (2005) ‘Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissues’, *Veterinary Diagnostic Investigations*, (17), pp. 346–350.

Waly, N. E. *et al.* (2005) ‘Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats’, *Journal of Comparative Pathology*, 133, pp. 253–260. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.05.004.

Wiedorn, K. H. *et al.* (2001) ‘Envision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH)’, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49(9), pp. 1067–1071. doi: 10.1177/002215540104900901.

Willard, M. D. *et al.* (2002) ‘Interobserver variation among histopathologic from dogs and cats’, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(8), pp. 1177–1182. doi: 10.2460/javma.2002.220.1177.

- Willard, M. D. *et al.* (2008) 'Effect of sample quality on the sensitivity of endoscopic biopsy for detecting gastric and duodenal lesions in dogs and cats', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(5), pp. 1084–1089. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0149.x.
- Wolfesberger, B. *et al.* (2017) 'Does categorisation of lymphoma subtypes according to the World Health Organization classification predict clinical outcome in cats?', *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(8), pp. 897–906. doi: 10.1177/1098612X16666119.
- Wollina, U. *et al.* (2013) 'Monoclonal anti-CD20 antibody therapy in cicatrical pemphigoid with oral and hypopharyngeal involvement and related conditions', *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 6(5), pp. 45–48.
- Zandvliet, M. (2016) 'Canine lymphoma: a review', *Veterinary Quarterly*. Taylor & Francis, 36(2), pp. 76–104. doi: 10.1080/01652176.2016.1152633.
- Zwingenberger, A. L. *et al.* (2010) 'Ultrasonographic evaluation of the muscularis propria in cats with diffuse small intestinal lymphoma or inflammatory bowel disease', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, pp. 289–292. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0457.x.

Annexes

Annexe 1 : Classification de Kiel

Grade	Sous-type cellulaire
Bas grade	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphocytaire : <ul style="list-style-type: none"> o leucémie lymphoïde chronique à cellules B o leucémie lymphoïde chronique à cellules T o mycosis fungoïdes et syndrome de Sezari - Lymphoplasmocytaire/cytoïde (immunocytome) - Plasmocytaire (plasmocytome) - Centrocytaire - Centroblastique/centrocytaire : folliculaire, folliculaire et diffus, diffus
Haut grade	<ul style="list-style-type: none"> - Centroblastique monomorphe ou polymorphe - Lymphoblastique : <ul style="list-style-type: none"> o type B o type Burkitt o type T o non classé - Immunoblastique : <ul style="list-style-type: none"> o avec différenciation plasmocytaire (B) o sans différenciation plasmocytaire (B ou T)

Annexe 2 : Classification de Lukes et Collins

<ul style="list-style-type: none"> - Type U (<i>undefined</i> - indéfini) - Types T : <ul style="list-style-type: none"> o Mycosis fungoïdes et syndrome de Sezari o A lymphocytes convolutés o Sarcome immunoblastique à cellules T - Types B : <ul style="list-style-type: none"> o A petits lymphocytes o A lymphocytes plasmacytoïdes o A cellules du centre folliculaire : grandes ou petites cellules, à noyau scindé ou non - Type histiocytique - Non classable
--

Annexe 3 : Working Formulation

Grade	Sous-type cellulaire
Bas grade	<ul style="list-style-type: none">- A petits lymphocytes- Folliculaire à majorité de petites cellules clivées- Folliculaire mixte à petites cellules clivées et grandes cellules
Grade intermédiaire	<ul style="list-style-type: none">- Folliculaire à prédominance de grandes cellules- Diffus à petites cellules clivées- Diffus mixte à petites cellules clivées et grandes cellules- Diffus à grandes cellules
Haut grade	<ul style="list-style-type: none">- Immunoblastique à grandes cellules- Lymphoblastique- A petites cellules non clivées
Divers	<ul style="list-style-type: none">- Composite- Mycosis fungoïdes- Histiocytaire- Plasmocytome extramédullaire- Inclassable- Autres

Annexe 4 : Classification de Kiel actualisée

Lymphomes B	<ul style="list-style-type: none">- Bas grade :<ul style="list-style-type: none">○ Lymphocytaire<ul style="list-style-type: none">▪ Leucémie lymphoïde chronique▪ Leucémie polylmphocytaire▪ Leucémie à tricholeucocytes○ Lymphoplasmocytaire○ Plasmocytaire○ Centroblastique<ul style="list-style-type: none">▪ folliculaire ± diffus▪ diffus○ Centrocytique- Haut grade :<ul style="list-style-type: none">○ Centroblastique○ Immunoblastique○ Anaplasique à grandes cellules○ Lymphome de Burkitt○ Lymphoblastique
-------------	---

Lymphomes T	<ul style="list-style-type: none">- Bas grade :<ul style="list-style-type: none">○ Lymphocytaire :<ul style="list-style-type: none">▪ Leucémie lymphoïde chronique▪ Leucémie pro lymphocytaire○ A petites cellules cérébriformes :<ul style="list-style-type: none">▪ Mycosis fungoïdes▪ Syndrome de Sezari○ Lympho-épithélioïde (Lymphome de Lennert)○ Anglo-immunoblastique○ Lymphome de la zone T○ Pléomorphe à petites cellules - Haut grade :<ul style="list-style-type: none">○ Pléomorphe à moyennes et grandes cellules○ Immunoblastique○ Anaplasique à grandes cellules○ Lymphoblastique
-------------	--

AGREMENT SCIENTIFIQUE
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Maxence DELVERDIER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Axelle DAUPHIN intitulée « Etude de l'expression immunohistochimique du CD20 au moyen d'un anticorps polyclonal dans le tissu lymphoïde normal et pathologique du chien et du chat » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 07/10/2019
Professeur Maxence DELVERDIER
Enseignant-chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Président du jury :
Professeure Monique COURTADE-SAIDI



Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET

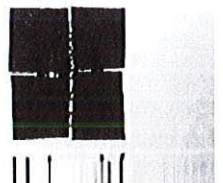
En déléguation,

Caroline LACROUX
Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante

Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,
par délégation,
Le Vice-Président de la CFVU
Richard GUILLET

Mme Axelle DAUPHIN
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Toulouse, 2019

NOM : DAUPHIN

Prénom : Axelle

TITRE : ETUDE DE L'EXPRESSION IMMUNOHISTOCHEMIQUE DU CD20 AU MOYEN D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DANS LE TISSU LYMPHOÏDE NORMAL ET PATHOLOGIQUE DU CHIEN ET DU CHAT

Résumé :

Le lymphome représente à l'heure actuelle 7 à 10% des néoplasies observées chez le chien et le chat. Malgré sa fréquence, le diagnostic peut se révéler compliqué lors de présentations ambiguës telles que les pathologies inflammatoires chroniques. C'est dans ce type de cas que réside l'intérêt de techniques comme l'immunohistochimie, qui permettent à la fois de poser le diagnostic et d'affiner la caractérisation des pathologies rencontrés, notamment au travers du phénotypage des populations cellulaires.

Ainsi, nous avons réalisé une étude expérimentale visant à évaluer l'expression du CD20, marqueur des lymphocytes B, au sein de tissus lymphoïdes chez le chien et le chat, au moyen de l'anticorps polyclonal PA5-16701. Le protocole d'immunohistochimie mis en œuvre a permis d'observer un marquage majoritairement membranaire moyen à fort des lymphocytes (normaux et pathologiques), retrouvé dans une grande diversité de situations normales, réactionnelles, et néoplasiques.

Mots clés : *CD20, chien, chat, tissu lymphoïde, lymphomes, immunohistochimie*

TITLE : STUDY OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF CD20 USING A POLYCLONAL ANTIBODY IN NORMAL AND PATHOLOGICAL LYMPHOID TISSUE OF DOGS AND CATS

Abstract :

Lymphoma currently accounts for 7 to 10% of canine and feline neoplasia. Despite its frequency, diagnosis can be complicated in ambiguous presentations such as chronic inflammatory diseases. It is in this type of cases that techniques such as immunohistochemistry are of interest. Indeed, this technique makes it possible both to diagnose and refine the characterization of the pathologies encountered, particularly through phenotyping of cell populations.

Thus, we conducted an experimental study to assess the expression of CD20, a marker of B-lymphocytes, in canine and feline lymphoid tissue, using the polyclonal antibody PA5-16701. The immunohistochemistry protocol we implemented made it possible to observe a mainly medium to strong membrane marking of lymphocytes (normal and pathological), found in a wide variety of normal, reactive and neoplastic situations.

Key words : *CD20, dog, cat, lymphoid tissue, lymphoma, immunohistochemistry*